

Beitrag zur Analyse von Aphrodisiaka

Disbui. München

1987

Kurt Mayrhofer



Beitrag zur Analyse von Aphrodisiaka

Dissertation der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Kurt Mayrhofer
aus Regensburg

München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin
Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.1987
Die Dissertation wurde am 26.02.1987
der Fakultät zur Beurteilung
eingereicht

Diese Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und
Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität
München, auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Professor Dr. F. Eiden

Für seine stets großzügige Unterstützung meiner Arbeit
sowie seine ständige Bereitschaft, Probleme jeglicher
Art zu diskutieren, möchte ich ihm herzlichst danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau A. Huber-Loth für ihre stets gute Zusammenarbeit bei der Bewältigung technischer Probleme.

Ferner danke ich folgenden Firmen und Instituten:

H. Finzelberg's Nachfolger (Andernach), Flachsmann AG (Zürich), Paninkret (Westerhorn), Luitpold (München), Kanolt (Höchstätt), Haidle & Maier (Stuttgart), Thiemann (Lünen), Schering (Berlin), Schwarzhaupt (Köln), Danimex (Hamburg), Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München und Institut für Lebensmittelchemie und analytische Chemie der Technischen Universität München, Weihenstephan.

Sie haben durch großzügiges Überlassen von Vergleichssubstanzen und Extrakten zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Darüberhinaus danke ich Frau B. Baumann, die meine Arbeit in druckfähige Form gebracht hat.

Für
meine Eltern

A. Einleitung	1
I. Definition und Geschichte der Aphrodisiaka	1
II. Liste der z.Zt. in Fertigarznei- mitteln enthaltenen Reinsubstanzen und Extrakten unter Angabe der pharma- kologischen Wirkung	3
B. Problemstellung	19
C. Analyse	20
I. Analyse von Extrakten pflanzlichen und tierischen Ursprungs	20
Yohimbe-Extrakt	20
Muir Puama-Extrakt	42
Cola-Extrakt	69
Ignatius-Extrakt	80
Hopfen-Extrakt	86
Extrakte aus tierischem Material (Cerebrum-, Testes- und Placenta- Extrakte)	91
II. Analyse von Fertigarzneimitteln	103
a) Arzneimittel nur mit Reinsubstanzen	103
Yohimbin-Spiegel (Kali-Chemie)	103
Pluriviron (Asche)	109
Tonol (Schering)	116
Pasuma Dragee (Cascan)	128
Pasuma Ampullen (Cascan)	144

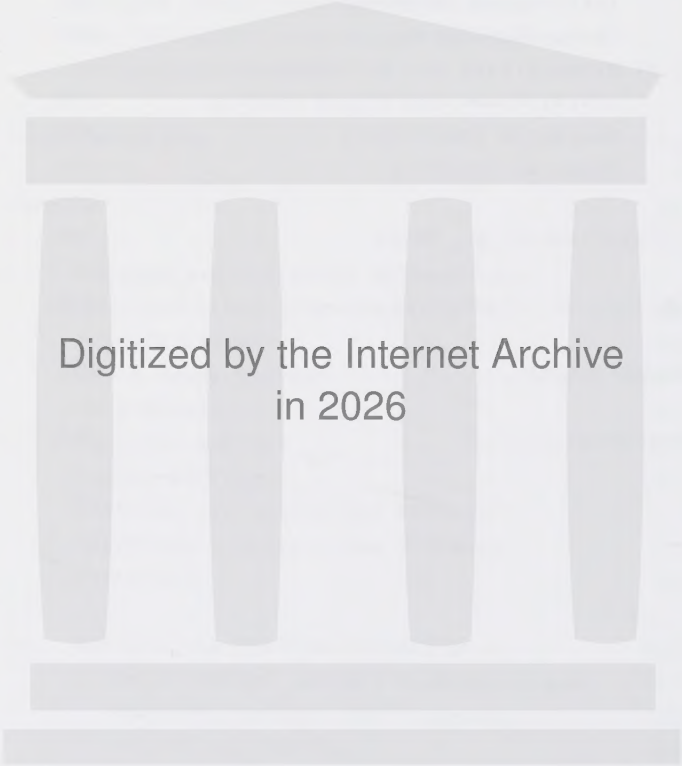
b) Arzneimittel mit Reinsubstanzen und pflanzlichen Extrakten	153
Testasa - e (Chefaro)	153
Puamin (Pharmakos)	169
Tonaton (Luitpold)	177
c) Arzneimittel mit Reinsubstanzen und Organextrakten	189
Testifortan (Promonta)	189
Okasa (Medikator)	202
d) Arzneimittel mit Reinsubstanzen, pflanzlichen und Organextrakten	215
Okasagold (Medikator)	215
Repursan (Kanolt)	224

III. Experimentelle Daten	246
---------------------------	-----

D. Diskussion der Ergebnisse	256
------------------------------	-----

E. Zusammenfassung	264
--------------------	-----

F. Literaturverzeichnis	265
-------------------------	-----



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. E I N L E I T U N G

I. Definition und Geschichte der Aphrodisiaka

1. Definition

Aphrodisiaka sind Mittel zur Anregung und Steigerung des Geschlechtstriebes ¹⁾. Der Name ist von Aphrodite, der griechischen Göttin der Liebe und Schönheit, abgeleitet.

2. Geschichte

Schon vor langer Zeit haben Menschen versucht, mit Hilfe von Arzneimitteln sexuelle Kräfte anzuregen und zu steigern.

Von griechischen und römischen Schriftstellern, Philosophen und Ärzten wie Homer, Aristoteles, Pythagoras, Ovid, Juvenal, Dioscurides und auch aus der Bibel sowie dem indischen Kama Sutra wissen wir, daß im Altertum in Kleinasien, Europa, Nordafrika und auch in Indien Aphrodisiaka hergestellt und oft gebraucht wurden. Im Mittelalter war es vor allem die arabische Welt, in der man Kenntnisse über Wirkung von Arzneimitteln - und damit auch über die Herstellung und Anwendung von Aphrodisiaka - antreffen konnte. Die Verwendung von Liebestränken, hergestellt und vertrieben von Ärzten, Kurpfuschern, Kräuterkundigen und Scharlatanen, erlangte in Europa in der Renaissance-, Barock- und Rokokozeit ihren Höhepunkt. Viele dieser aus Pflanzen oder Tieren gewonnenen Liebestränke, die "pocula amatoria" oder "pocula libidinis" waren sicherlich physiologisch unwirksam, sie verdanken ihren - manchmal weltweiten - Ruf dem Aberglauben und der damit verbundenen Einbildung, sie waren also das, was man heute Placebo nennt. Um hier einige Beispiele anzuführen: Katzen- oder Eselhirn, Menstruationsblut, Hahnenkämme, gepulverte Schamhaare, Rhinozerushörner,

Penis und Brunstschweiß eines Hengstes oder der Hoden eines Ziegenbocks. Aber auch Lebensmittel wie Kürbiskerne, Selleriewurzeln, Trüffel oder exotische Gewürze wurden häufig zugesetzt und der Glaube an die sexual stimulierenden Eigenschaften von Spargel, Sellerie oder Austern ist auch heute noch anzutreffen. Frühzeitig war man jedoch auch schon über die Wirkung von Zubereitungen (Extrakten, Tinkturen, Salben) aus Pflanzen und Tieren informiert, deren Inhaltsstoffe inzwischen gut untersucht und als stark wirksam bekannt sind, z.B.: Alraune, Bilsenkraut, Stechapfel (Tropanalkaloide), Steppenraute (ß-Carboline), Brechnuß (Strychnin), Rauschpfeffer (Pyranterivate), Kokastrauch (Cocain), Kathblätter (Phenylaminoethanole), Yohimberinde (Yohimbin), indischer Hanf (Cannabinoide), sowie - besonders häufig erwähnt - die spanische Fliege, die Cantharidin enthält ^{2,3}).

Oft hatte die Einnahme solch starker Gifte Krankheit oder Tod zur Folge und deshalb wurde häufig der Verkauf oder die Verwendung von Liebestränken schwer bestraft, so in Byzanz unter Justinian, durch Gesetze des Staufers Friedrich II. bis zum Preußischen Landrecht aus dem 18. Jahrhundert.*

Das Interesse an potenzsteigernden Mitteln hat sich bis in unsere Zeit erhalten, weshalb diese Mittel auch heute noch in größerer Zahl in Apotheken und speziellen Verkaufs- und Versandgeschäften angeboten werden. Die Zahl der in dieser Aphrodisiaka enthaltenen Stoffe ist immer noch groß, und oft genug enthalten auch diese Potenzmittel manche der seit dem Altertum bekannten Extrakte aus Pflanzen und Tieren, und häufig ist der Wirkungsnachweis bis heute nicht gelungen.

* dort heißt es (§ 867):

Wer durch Liebestränke tötet, hat eine zehn- bis fünfzehnjährige Zuchthausstrafe verwirkt.

11. Liste der z. Zt. in Fertigarzneimitteln enthaltenen Reinsubstanzen und Extrakte unter Angabe der pharmakologischen Wirkung, soweit diese bekannt ist.

Yohimbin-HCl und Yohimbe-Extrakt

Als Hydrochlorid:

in Yohimbin-Spiegel, Pluriviron, Tonol, Pasuma, Testifortan

Als Yohimbin-Extrakt in:

Repursan, Testasa-e, Tonaton, Puamin

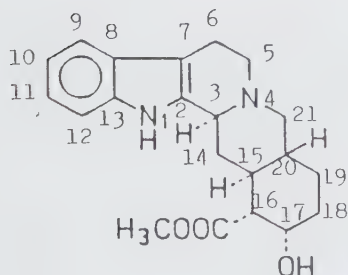
Die Rinde des Yohimbe Baums (*Pausinystalia yohimbe*, Rubiaceae) ist bei den Eingeborenen Westafrikas schon lange als Aphrodisiakum bekannt. Diese Rubiaceae wächst vorwiegend in Kamerun und im Kongo ^{4,5)}. Dem deutschen Chemiker L. Spiegel gelang 1896 die Isolierung von Yohimbin 1, dem Hauptalkaloid ⁶⁾.

Yohimbin ist ein 17 α -Hydroxy-yohimban-16 α -carbonsäuremethylester.

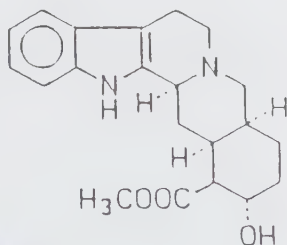
In größeren Mengen befinden sich in der Droge noch folgende Isomere ⁵⁾:

α -Yohimbin (Rauwolfscin) 2: 3 α , 15 α , 16 β , 17 α , 20 α

Alloyohimbin 3 α , 15 α , 16 α , 17 β , 20 α



1



2

In geringen Mengen findet man die ebenfalls stereo-isomeren β -Yohimbin und Corynanthin sowie weitere Alkaloide, die ebenfalls Abkömmlinge vom 1,2,3,4, Tetrahydro- β -carbolin sind, in der Rinde.

Der Gesamtalkaloidgehalt liegt bei ca. 2.7 - 5.9%.

Der Gehalt an Yohimbin beträgt ca. 1.5%. Als weitere Inhaltsstoffe findet man Yohimbesäure, Gerbsäure und ein nicht näher bezeichneter Farbstoff ⁷⁾.

Drogenextrakte wie auch die Reinsubstanz Yohimbin-HCl finden heute bei Tier und Mensch als Aphrodisiakum Verwendung ³⁾. Im Tierversuch soll die Verabreichung von Yohimbin zu einer starken Hyperämie der Genitalien, zu längeren Erektionszeiten und erhöhter Kopulationsfrequenz führen. Bei Kühen und Schafen ist eine kurzzeitige Steigerung der Milchmenge beobachtet worden ⁸⁾. Beim Menschen führt Yohimbin zu einer Erhöhung der Reflexerregbarkeit der im Lumbosacralmark gelegenen, für Erektion und Ejakulation zuständigen Zentren, sowie zu einer verstärkten Durchblutung der Abdominalorgane ^{8,9)}.

Aus einem Vergiftungsfall ist bekannt, daß eine sehr hohe Dosis (1.8 g Yohimbin-HCl) zu weiteren, das Zentralnervensystem, das Herz und die peripheren Gefäße betreffenden toxischen Symptomen führte sowie zu Priapismus ⁸⁾.

Es wurden Studien an Patienten beschrieben, denen ein Yohimbe-Extrakt enthaltendes Mischpräparat in regelmäßigen Abständen über mehrere Wochen hinweg verabreicht wurde. Diese Untersuchungen wurden durch phallographische Messungen ^{10,12)} kontrolliert und durch Doppelblindversuch ^{11,12)} abgesichert. Danach kann Yohimbin Libidosteigerung sowie verstärkte und häufigere Erektionen bewirken. Inwieweit diese Steigerung der Potentia coeundi auf eine selektive Wirkung des Yohimbins mit präsynaptischer α_2 - Rezeptorblockade oder auf allgemeine endokrine Effekte des Yohimbins

zurückzuführen ist, ist noch nicht geklärt ¹³⁾.
Yohimbin bzw. der Yohimbe-Extrakt (auch bei diesem
Phytotherapeutikum ist über den Einfluß und die Wirkung
der Nebenalkaloide noch wenig bekannt ¹³⁾) ist offen-
sichtlich das einzige Aphrodisiakum mit nachgewiesener
Wirkung.

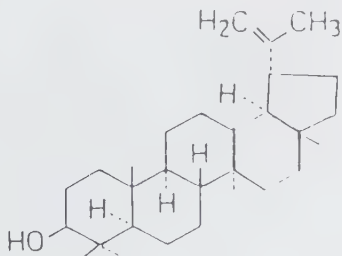
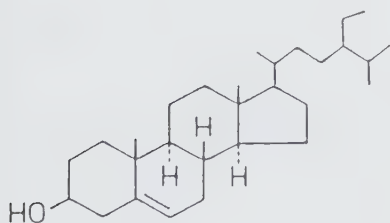
Muira Puama-Extrakt

in: Testasa-e, Repursan, Puamin
stets gemeinsam mit Yohimbe-Extrakt

Muira Puama (*Ptychopetalum olacoides* und *P. uncinatum*
Olacaceae) auch "Potenzholz" genannt - ist ein in
Brasilien, vor allem im Amazonasgebiet wachsender Strauch.
Die Droge - man verwendet vor allem Wurzel- und Stamm-
holz - ist in Brasilien offizinell und gilt dort als be-
liebtes Anregungs- und Volksmittel gegen Impotenz ^{14,15)}.
Es soll appetitanregende, verdauungsfördernde und das
Zentralnervensystem anregende Wirkungen ^{14,16,8)} besitzen;
es wird auch gegen Ruhr und Menstruationsstörungen ver-
wendet ¹⁷⁾. Man nimmt es als Tee und in Weinauszügen ein,
äußerlich werden Genitalbäder angewendet.

Exakte Beweise der pharmakologischen Wirkung dieser Droge
sind bisher nicht beschrieben worden. Behauptungen über
die potenzsteigernde Wirkung werden jedoch immer wieder
publiziert ¹⁸⁾.

Lipophile Inhaltsstoffe wurden von Auterhoff und Pankow
¹⁹⁻²¹⁾ isoliert und untersucht. Sie fanden neben einigen
Fettsäuren das im Pflanzenreich weit verbreitete β -Sito-
sterin 3, sowie ein weiteres Steroid, das Lupeol 4.



Ob diese beiden Steroide eine hormonartige - evtl. potenzsteigernde Wirkung besitzen, wurde noch nicht geklärt.

Strychnin und Ignatius-Extrakt

Als Strychnin:

in Pasuma Ampullen

Als Strychninnitrat:

in Tonol

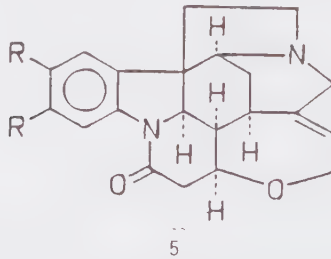
Als Strychniniumglycerophosphat:

in Pasuma Dragees

Als Ignatius-Extrakt:

in Tonaton, Testasa-e (ältere Chargen)

Die Ignatiusbohne (*Strychnos ignatii*, Loganiaceae) wächst auf den Phillipinen und wird auch in China und Indien angebaut. Die Hauptwirkungsstoffe des als Droge verwendeten Samens sind 2.5 - 4% Alkaloide, wovon Strychnin 5 45 - 60% ausmacht. Daneben findet man noch Brucin 5 und andere Nebenalkaloide ^{22,23}).



Strychnin: R =

Brucin: R =

Strychnin oder Strychnin enthaltende Extrakte sind in Tonika bzw. Roborantien anzutreffen. Sie wirken appetit anregend und sollen das Allgemeinbefinden verbessern. Strychnin wirkt auf verschiedene Teile des Zentralnervensystems erregend - vor allem auf das Atem- und Vasomotorienzentrum. Durch Aktivierung des extrapyramidal motorischen Systems wird der Ruhetonus der Muskulatur gesteigert und die Blasenmuskulatur gestrafft ^{8,24}).

Coffein und Cola-Extrakt

Als Coffein-Monohydrat:

in Pasuma Dragees

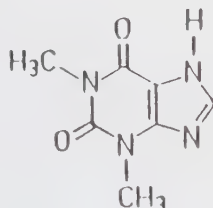
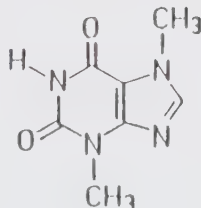
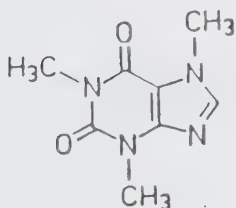
Als Cola-Extrakt:

in Testasa-e, Repursan

Die Colanuß (*Cola nitida* und *C. acuminata*, Sterculiaceae) kommt im tropischen Afrika vor, wird aber auch in Madagaskar, Mauritius, Indien und Südamerika angebaut.

Als Droge findet der von der Schale befreite Samen Verwendung (Colae Semen).

Die wichtigsten Bestandteile sind 0.6 - 3.6% Coffein 6, und in geringeren Mengen Theobromin 7 ^{25,26}), in Spuren Theophyllin 8.

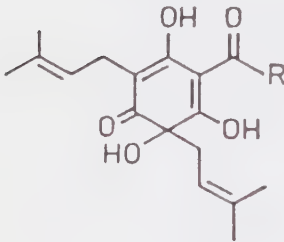


In Afrika sind Colanüsse als anregendes Genußmittel und Aphrodisiakum beliebt, sowie als Herztonikum und Diuretikum in Verwendung ⁸⁾.

Beim Coffein steht eine zentrale analeptische Wirkung im Vordergrund, während Theophyllin und Theobromin aufgrund besserer Durchblutung der Gefäße eine deutliche Herzwirkung aufweisen ²⁷⁾.

Hopfen-Extrakt:
in Okasagold

Der Hopfen (*Humulus lupulus*, Cannabaceae) wird überwiegend in Europa, Australien und den USA als rechtswindende, bis zu 6-m-hohe Schlingpflanze angebaut. Die Fruchtstände der weiblichen Pflanze (Strobuli Lupuli) werden als Droge verwendet. Sie enthalten neben ätherischen Ölen auch die instabilen Bittersäuren Humulon 9 und Lupulon 10 ²⁸⁾.

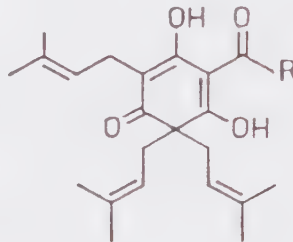


9

α -Säuren

(α -Bittersäuren, α -lupulic acids)

R	
$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Humulon
$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Cohumulon
$-\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5$ CH_3	Adhumulon



10

β -Säuren

(β -Bittersäuren, β -lupulic acids)

R	
$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Lupulon
$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Colupulon
$-\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5$ CH_3	Adlupulon

Schon im Mittelalter wurde der Hopfen medizinisch verwandt. Man schreibt ihm unter anderem sedative und schlaffördernde Wirkung zu, die vor allem von Abbauprodukten der Bittersäuren, z.B. 2-Methyl-3-Buten-2-ol herrühren sollen ²⁹⁻³¹⁾

Dieser beruhigenden und auch anaphrodisierenden Wirkungen wegen wird Hopfen in der Homöopathie - nach dem "Simile-Prinzip" - zur Behandlung von Potenzschwächen herangezogen ⁸⁾. Auch eine östrogene Wirkung ³²⁻³⁴⁾, die allerdings angezweifelt wird ³⁵⁾ wird dem Hopfen nachgesagt. Ich habe wissenschaftlich fundierte Begründungen für die Verwendung von Hopfen-Extrakten in Aphrodisiaka nicht finden können.

Extrakte aus tierischem Material

Extr. Cerebrum sicc.:

in Repursan, Okasa, Okasagold

Extr. Testes sicc.:

in Repursan, Okasa

Auszug aus Testeskeimdrüsen:

in Testifortan

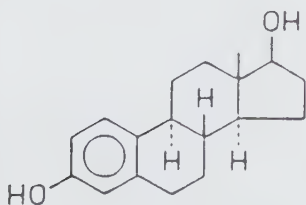
Extr. Placenta sicc.:

in Okasagold

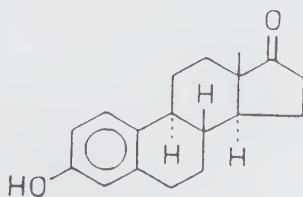
Extr. Diencephalon sicc.:

in Okasa, Okasagold

Placenta-Gesamtextrakte werden aus tierischen Placenten entnommen. Neben den östrogenen Substanzen (z. B. Östradiol 11, Östron 12) - Gehaltsangaben fehlen - sollen gewisse "Biogene Stimulatoren" durch eine regulierende Wirkung auf die Atmung und den Stoffwechsel von Bedeutung sein. Placenta-Extrakte, welche in der Kosmetik angewandt werden, müssen frei von Sexualhormonen sein ³⁶⁾.

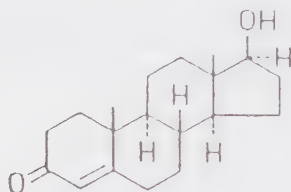


11



12

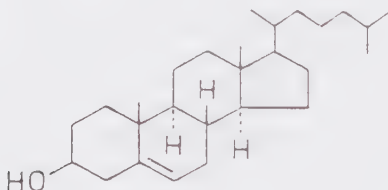
Testes-Extrakte, hergestellt aus Stierhoden, sollen neben androgenen Hormonen (z.B. Testosteron 13) vor allem Proteine enthalten, welche als Biokatalysatoren die hormonelle Wirkung des Extraktes ergänzen sollen ³⁶⁾. Die Hormonwirkung wird jedoch wegen der geringen Hormonkonzentration angezweifelt ³⁷⁾.



13

Gehirn-Extrakte sollen ebenfalls "allgemeine stimulierende Faktoren" enthalten und so die Wirkung der Kombinationspräparate verstärken. Zuverlässig erscheinende Untersuchungen sind nicht bekannt.

In Organ-Extrakten kommt im allgemeinen das weit verbreitete Cholesterin 14 vor.



14

Synthetische Hormone

Mesterolon: in Pluriviron, Tonol

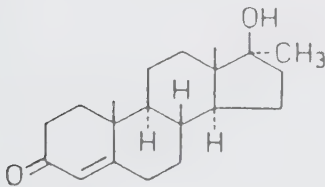
Methyltestosteron: in Pasuma Dragees

Testosteronpropionat: in Pasuma Ampullen

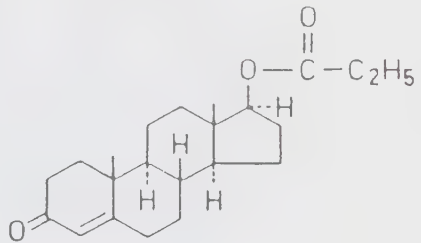
Androgene Sexualhormone, die einerseits zur Ausbildung der sekundären Geschlechtsorgane führen, beeinflussen andererseits aber durch einen anabolen Effekt Potenz, Libido sowie den normalen Verlauf von Spermiogenese und Fertilität ³⁸⁾.

Der Testosteronspiegel im Blutplasma ist im Alter von 25 - 30 Jahren am höchsten und nimmt dann aber mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab. Im sog. "Klimakterium virile" kann es dann wegen zu geringer Androgensekretion zu Störungen der Potentia coeundi kommen ³⁹⁾.

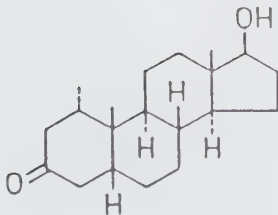
Diesem sek. Hypogonadismus versucht man durch die Applikation von synthetischen Hormonen abzuhelpfen, z.B. Methyltestosteron 15, Testosteronpropionat 16 und Mesterolon 17 ³⁹⁾. Diese Steroide zeigen bei oraler - (15 und 17) bzw. 16 bei parenteraler Anwendung im Unterschied zu Testosteron eine bessere Wirksamkeit ³⁸⁾, da dieses schnell in der Leber metabolisiert wird ⁴⁰⁾. Geringe Mengen an Testosteron sollen auch bei Frauen zu einer Libidosteigerung führen ³⁹⁾.



15



16



17

Tocopherol (Vitamin E)

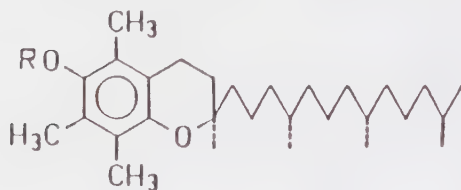
als α -Tocopherolacetat:

in Tonol, Pasuma (Dragees und Ampullen),

Puamin, Repursan

als Tocopherolsuccinat:

in Okasa, Okasagold



Tocopherolacetat:

R = $\text{CH}_3\text{CO}-$

Tocopherolsuccinat:

R = $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$

18

Tocopherol 18 ist in einer Reihe von Sexualtonika anzutreffen ³⁷⁾, da dieses Vitamin neben anderen Funktionen, z.B. als Radikalfänger ⁴¹⁾ auch die Aktivitäten der Hypophyse anregen soll. Die Hypophyse, die Vitamin E enthält, soll durch weitere Gaben von Vitamin E zur Ausschüttung gonatropher Hormone angeregt werden, welche wiederum die Testosteronproduktion stimulieren ³⁷⁾. Ein Mangel an Vitamin E soll zu einer degenerativer Veränderung der Geschlechtsorgane führen ¹⁸⁾. All diese Angaben kann man nur mit Vorbehalt und Skepsis zur Kenntnis nehmen, da ihnen bestenfalls Interpretationen von Tierversuchen zugrunde liegen ⁴²⁾. Möglich ist, daß eine ausreichende Vitamin E Zufuhr (mittlerer Tagesbedarf angeblich 30mg) die Leistungsfähigkeit fördert, doch daß eine zusätzliche - oft hohe - Vitamin E Dosis einen weiteren Einfluß auf die körperliche Leistungsfähigkeit hat, ist noch nirgendwo nachgewiesen worden ⁴³⁾. Obwohl ein sexualstimulierender Effekt nicht erwiesen ist, kann man Vitamin E häufig in Aphrodisiaka - bisweilen als "Fruchtbarkeitsvitamin" bezeichnet - antreffen ³⁹⁾.

Weitere Vitamine

Ascorbinsäure:

in Okasa, Okasagold, Repursan

Thiamin-HCl:

in Okasa, Okasagold, Repursan

Riboflavin:

in Okasa, Okasagold, Repursan

Pyridoxin-HCl:

in Repursan

Nicotinamid:

in Okasa, Okasagold, Repursan

Ca-Pantothenat:

in Okasa, Okasagold, Repursan

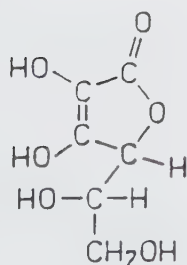
Retinolacetat:

in Repursan

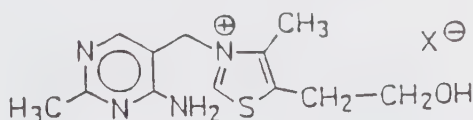
Mg-Nicotinat:

in Tonol

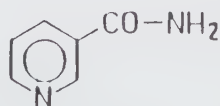
Ein Mangel an Vitaminen kann zu Störungen sexueller Fähigkeit führen. Ein Zusatz von Vitaminen in Aphrodisiaka hat jedoch nur bei Hypovitaminosen einen Sinn ⁴²⁾, die bei unserer Ernährung selten anzutreffen sind.



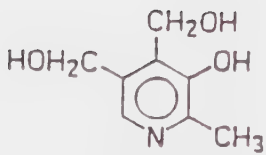
19



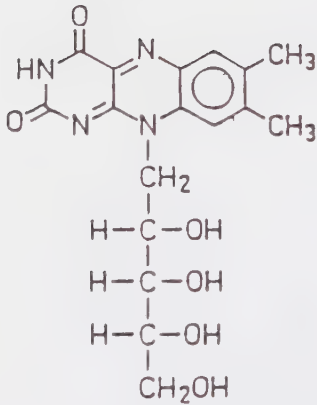
20



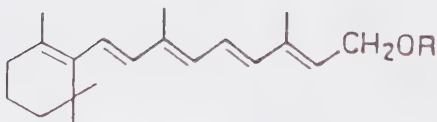
21



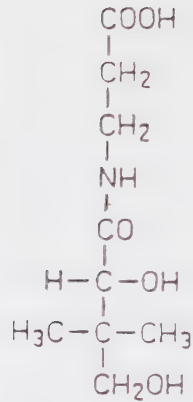
22



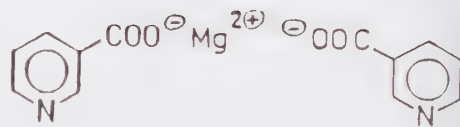
24



26



23



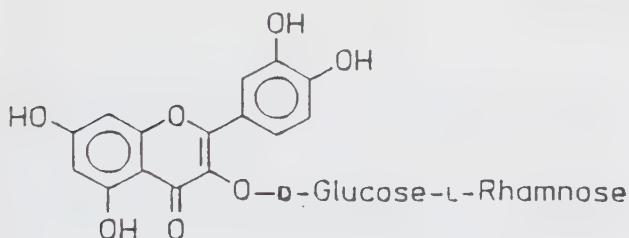
25

R = CH₃CO-

19 = Ascorbinsäure, 20 = Thiamin, 21 = Nicotinamid, 22 = Pyridoxin, 23 = D-Pantothenat, 24 = Riboflavin, 25 = Magnesiumnicotinat, 26 = Retinolacetat

Rutin:
in Repursan

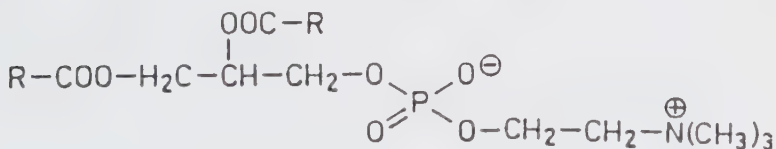
Rutin 27 wird zu den Vitamin P-Faktoren gerechnet und meistens mit wasserlöslichen Vitaminen (z.B. in Multivitamin-tabletten) verabreicht. Es soll die Wirkung von Vitamin C unterstützen ⁴⁴⁾.



27

Lecithin:
in Repursan

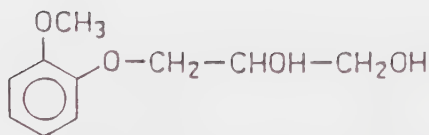
Lecithin 28 gilt allgemein als Stärkungsmittel und wird unter anderem in Roborantien verwendet ⁴⁵⁾. Eine Wirkung ist bisher nicht nachgewiesen worden.



Guaifenesin:
in Repursan

28

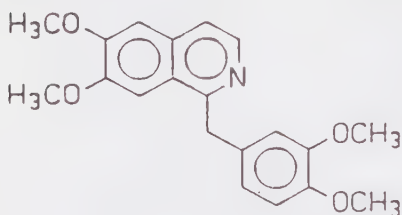
Guaifenesin 29 wird üblicherweise in Husten- und Grippemitteln verwendet. Vielleicht spielt bei der Verwendung in Aphrodisiaka die zentral dämpfende Wirkung eine Rolle.



29

Papaverin-HCl:
in Testifortan

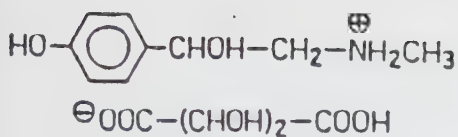
Papaverin 30 soll in Aphrodisiaka seine Wirkung als Spasmolyticum entfalten und so krampflösend im Magen-Darm-Trakt, den Gallen- und Harnwegen, sowie im Uterus wirken. Es soll auch bei peripheren Durchblutungsstörungen von Nutzen sein. ^{46,47)}.



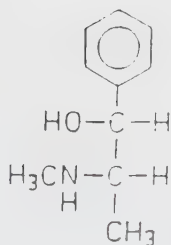
30

Oxedrintartat:
in Pasuma
Ephedrin-HCl:
in Tonaton

Sowohl Oxedrintartat 31 als auch L-Ephedrin 32 sind Sympathomimetika ⁴⁸⁾, die durch Anregung der Blutzirkulation auch die Durchblutung im Genitalbereich beeinflussen. Ephedrin wirkt nicht nur peripher sondern auch zentral ⁴⁸⁾.



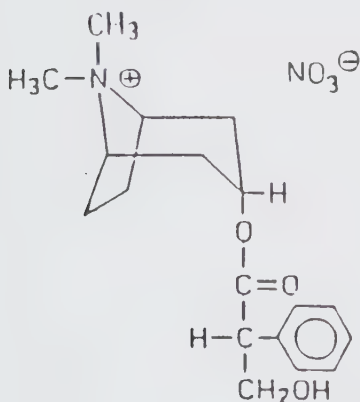
31



32

Atropinmethonitrat:
in Tonaton

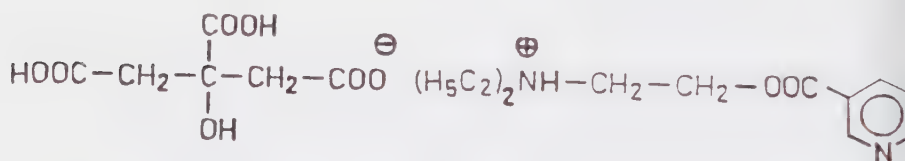
Atropin ist ein bewährtes Parasympatholyticum. Solche Wirksubstanzen sind indiziert unter anderem bei Spasmen im Bereich der Harnwege, sowie der (weiblichen) Genitalorgane ⁴⁹⁾. Das im Präparat verwendete Atropinmethonitrat ³⁷⁾ wirkt nicht zentral, da es als quartäres Salz die Blut-Hirn Schranke nicht überwinden kann ⁴⁹⁾.



33

Nicametat-dihydrogencitrat:
in Puamin

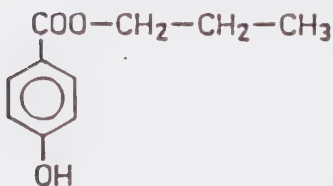
Nicametat-dihydrogencitrat 34 zeigt - ähnlich wie Papaverin, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt - eine durch Gefäßweiterung bedingte verbesserte Durchblutung ⁵⁰⁾.



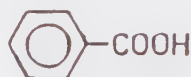
34

Benzoessäure und p-Hydroxybenzoessäurepropylester:
in Testifortan

p-Hydroxybenzoessäurepropylester 35 und Benzoesäure 36 sind als Konservierungsstoffe in Testifortan-Ampullen enthalten.



35



36

B. P R O B L E M S T E L L U N G

Meine Aufgabe war es, für eine Reihe bei uns im Handel erhältlicher und häufig gekaufter Aphrodisiaka Nachweis- und Bestimmungsmethoden zu entwickeln.

Bei diesen Arzneimitteln handelt es sich meistens um Zubereitungen, die neben Einzelwirkstoffen Trockenextrakte enthalten, die aus Pflanzen oder Tieren genommen worden sind. Dadurch wird die Analyse dieser Aphrodisiaka schwierig: Solche Extrakte können nämlich viele Inhaltsstoffe enthalten (z.B. Alkaloide oder Peptide), wovon im allgemeinen nur wenige bekannt und zugänglich sind; andererseits enthalten die Aphrodisiaka auch Extrakte, deren Wirkstoffe bisher nicht beschrieben wurden, oder bei denen die bisher bekanntgewordenen Untersuchungsergebnisse widersprüchlich sind.

Deshalb war geplant, solche Extrakte zu standardisieren, oder aber durch Aufspüren und Identifizieren von Wirkstoffen bzw. durch Einsatz von Hydrolyse - oder Pyrolysemethoden eine Identifizierung der Extrakte zu ermöglichen.

In jedem Fall sollten die Methoden praxisgerecht sein, d.h. es sollten jeweils möglichst viele Wirkstoffe unter Einsatz interner Standardsubstanzen möglichst in einem Analysengang nachweis- und bestimmbar sein.

C. A N A L Y S E

I. Analyse von Extrakten pflanzlichen und tierischen Ursprungs

Yohimbe-Extrakt

(verschiedene Hersteller)

1. Bisher beschriebene Verfahren

Eine Reihe von chromatographischen und spektroskopischen Methoden zur Bestimmung von Indolalkaloiden wurde beschrieben - insbesondere zur Analyse der pharmakologisch interessanten Vinca-, Catharanthus- und Rauwolfiaalkaloide⁵¹⁾. Die chromatographischen Bestimmungen von Yohimbin beziehen sich meistens auf die Reinsubstanz. Auch papier⁵²⁾- und dünn-schichtchromatographische Verfahren wurden ohne⁵³⁻⁵⁹⁾ und mit photometrischer Auswertung von Yohimbin als Reinsubstanz durchgeführt. Gaschromatographisch konnte Yohimbin ebenfalls nachgewiesen und bestimmt werden^{63,64)}. Liquidchromatographische Bestimmungen von Yohimbin sind mit der Reinsubstanz^{55, 65-67)} sowie mit Rauwolfia Drogen⁶⁸⁾ und Catharanthus Zellkulturen⁶⁹⁾ an polaren und auch unpolaren stationären Phasen durchgeführt worden.

2. Eigene Untersuchungen

Ich habe Yohimbe-Extrakte verschiedener Hersteller, bzw. Extrakte, welche von pharmazeutischen Betrieben in ihren Arzneimitteln verwendet werden, untersucht.

2. 1. Liste der untersuchten Extrakte

(1) Extr. Yohimbehe sicc.

VP 203/82

Gehaltsangabe: 10% Gesamtalkaloide

H. Finzelberg's Nachfolger, Andernach/Rhein

- (2) Extr. Yohimbehe spir.sicc.
WE: E 12838430
ohne Gehaltsangabe
Fa. Luitpold, München
- (3) Extr. Yohimbehe
Analysen-Nr. KE 85203
ohne Gehaltsangabe
Tiemann Arzneimittel, Lünen
- (4) Extr. Cort. Yohimbehe sicc.
Analysen-Nr. 14213
ohne Gehaltsangabe
Schwarzhaupt KG, Köln
- (5) Extr. Yohimbehe e cort. sicc.
Muster-Nr. 360/4
Gehaltsangabe: 8% Alkaloide
Birkenweg, Kleinostheim/Mainz
- (6) Extr. Yohimbehe spir. sicc.
Muster-Nr. 26
ohne Gehaltsangabe
Haidle & Maier, Stuttgart

2. 2. Aussehen

Extrakt 1: goldbraunes Pulver
Extrakt 2: dunkelbraunes Pulver
Extrakt 3: hellgelbes Pulver
Extrakt 4: hellgelbes Pulver
Extrakt 5: schwarzbraunes Pulver
Extrakt 6: schwarzbraunes Pulver

2. 3. Löslichkeit

	H ₂ O	EtOH(50%)	EtOH	CHCl ₃	n-Hexan
Extrakt 1:	teilw.	gut	teilw.	wenig	wenig
Extrakt 2:	wenig	gut	teilw.	wenig	nicht
Extrakt 3:	gut	gut	teilw.	teilw.	nicht
Extrakt 4:	gut	gut	teilw.	teilw.	nicht
Extrakt 5:	wenig	wenig	teilw.	wenig	wenig
Extrakt 6:	wenig	wenig	teilw.	wenig	wenig

2. 4. Nachweis und Bestimmung

2. 4. 1. Dünnschichtchromatographie

Die methanol-wässrige Lösung bzw. das Filtrat des jeweiligen Extraktes wurde auf Kieselgel oder Aluminiumoxid Platten aufgetragen und mit 4 verschiedenen Laufmitteln entwickelt. Außerdem wurde die org. Phase, die nach dem Stas-Otto Trennungsgang die Alkaloide enthalten soll zweidimensional mit je einem sauren und basischen Laufmittel auf einer Kieselgelplatte entwickelt. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht und Besprühen mit Dragendorffs-D1* sowie mit Van Urcks-Reagenz D6*. Über weitere Farbreaktionen zur Sichtbarmachung von Yohimbin auf der Platte siehe S.27 Auch Rauwolfscin, ein Yohimbinisomer, konnte so neben Yohimbin in den Extrakten nachgewiesen werden.

2. 4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Die quantitative Bestimmung des Yohimbins wurde bei sämtlichen Extrakten mit einem Gemisch von Acetonitril und basischem Puffer als mobile Phase mit Hilfe der Gradientenelution auf reversed-phase Säulen und mit UV-Detektion bei 254 nm unter

* Sämtliche Sprühreagenzien werden mit D bezeichnet und nummeriert, sie werden in einer Tabelle auf S.247 aufgeführt.

Verwendung eines internen Standard (Valium[®]) durchgeführt. Eine akzeptable Trennung der Extrakte ließ sich auch mit der Ionenpaar-chromatographie unter Gradientenelution erreichen. Eine Analyse mit einem Gemisch von Methanol und basischem Puffer als mobile Phase ermöglichte eine gute Auftrennung und zuverlässige quantitative Auswertung. (siehe Bestimmung S. 152)

Eine Anreicherung der Alkaloide mit Hilfe eines starken sauren Ionenaustauschers führte bei Verwendung eines internen Standards zu gleichen Ergebnissen wie das Auflösen in einem geeigneten Lösungsmittelgemisch (z. B. MeOH 60%). Die Anreicherung besitzt jedoch den Vorteil, daß vor allem bei komplizierten Fertigarzneimitteln schon eine Vortrennung erreicht wird und somit eine unnötige Belastung der analytischen Säule unterbleibt; der gleiche Effekt ließ sich durch das Verwenden einer Vorsäule erreichen.

3. Ergebnisse

3. 1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

3. 1. 1. DC 1 (Bedingungen siehe exp. Teil S.28/29)

	Rf-Wert	UV 254 nm	366 nm	D1
Reinsubstanzen				
Yohimbin-HCl	0.83	+	blau	+
Rauwolfscin-HCl	0,86	+	blau	+
Probe	0.01	+	weiß/braun	+
(Extraktlösungen	0.04	-	graublau	-
1 - 6)	0.20	-	blau	-
	0.28	-	blau	-
	0.53	-	hellblau	-

Rf-Wert	UV 254 nm	366 nm	D1
0.66	-	gelb	+
0.68	+	blau	+
0.71	-	-	+
0.73	-	-	+
0.74	-	dunkelblau	-
0.80	-	hellgelb	-
0.83	+	hellblau	+
0.84	-	hellblau	-
0.86	+	hellblau	+
0.89	+	zitronengelb	+

3. 1. 2. DC 2 (Bedingungen siehe exp. Teil S. 28/29)

Reinsubstanz	Rf-Wert	UV 254 nm	366 nm	D1
Yohimbin-HCl	0.88	+	gelb	+
Rauwolfscin-HCl	0.93	+	gelb	+
Probe	0.00	-	blau	-
(Extraktlösungen	0.04	-	blau	-
1 - 6)	0.08	-	-	+
	0.19	-	gelb	-
	0.21	-	blau	-
	0.24	+ h-bl	dunkelblau	-
	0.26	-	blau	-
	0.28	-	blau	-
	0.31	+ h-bl	-	-
	0.33	-	gelb	+
	0.37	-	blau	+
	0.39	-	gelb	+
	0.43	-	dunkelblau	-
	0.45	+ h-bl	-	-
	0.47	-	hellblau	-
	0.53	-	gelb	-
	0.59	-	gelb	-
	0.66	-	gelb	-
	0.72	+	gelb	+
	0.77	+	gelb	+
	0.81	+	gelb	+

Rf-Wert	UV 254 nm	366 nm	D1
0.83	+	-	-
0.88	+	gelb	+
0.93	+	gelb	+
0.95	+	-	-
1.00	+	gelb	+

3. 1. 3. DC 3 (Bedingungen siehe exp. Teil S. 28/29)

	Rf-Wert	UV 254 nm	366 nm	D1
Reinsubstanzen				
Rauwolfscin-HCl	0.35	+	gelb	+
Yohimbin-HCl	0.38	+	gelb	+
Probe	0.02	+	braun	+
(Extraktlösungen	0.03	-	dunkelgrau	+
1 - 6)	0.08	-	-	+
	0.13	-	gelb	-
	0.17	-	gelb	-
	0.21	+	hellblau	+
	0.25	-	graublau	-
	0.31	+	gelb	+
	0.35	+	gelb	+
	0.38	+	gelb	+
	0.40	-	hellblau	-
	0.51	+	blau	+
	0.54	-	blau	-
	0.64-0.83	-	gelb	-

3. 1. 4. DC 4 (Bedingungen siehe exp. Teil S.28/29)

	Rf-Wert	UV 254 nm	366 nm	D1
Reinsubstanz				
Rauwolfscin-HCl	0.58	+	gelb	+
Yohimbin-HCl	0.63	+	gelb	+
Probe	0.01	+	rötlich	+
(Extraktlösungen	0.03	-	gelb	+
1 - 6)	0.09	-	dunkelgrau	-
	0.13	+	hellblau	-
	0.32	+	gelb	-

Rf-Wert	UV	254 nm	366 nm	D1
0.38	+		gelb	+
0.42	+		gelb	+
0.47	-		hellgelb	-
0.58	+		gelb	+
0.62	+		gelb	+
0.65	-		hellgelb	-
0.70	-		blau	-
0.78	-		gelb	-
0.89	+		hellgelb	+

Alle Extrakte zeigen in den Laufmitteln (DC 1 - DC 4) jeweils das gleiche Muster, bei z.T. unterschiedlichen Intensitäten. Gleich blieb jedoch die Fleckenzahl, die nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz in den einzelnen Laufmitteln zu beobachten war. Eine Vielzahl weiterer Flecken war nur so schwach sichtbar (vor allem bei 366 nm), daß eine konkrete Charakterisierung nicht möglich war.

3. 2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Nach Entwicklung des Stas-Otto-Extraktes in zwei verschiedenen Laufmitteln (nacheinander im rechten Winkel, siehe exp. Teil S. 31) war bei beiden Extraktchromatogrammen (1 und 2) kein Unterschied bei den intensiveren Flecken zu erkennen.

Rf-Werte der Flecken, die im UV-Licht bei 254 und 350 nm deutlich zu erkennen waren, und die sich sowohl mit Dragendorffs Reagenz (orange) als auch mit Van Urcks Reagenz (blauviolett) auf gelblichem Untergrund aufklären ließen:

	Extrakt 1	Extrakt 2
Rf-Werte	0.18/0.55	0.20/0.51
(LM 1 / LM 2)	0.33/0.61	0.34/0.55
	0.35/0.41	0.36/0.41
	0.36/0.47	0.38/0.45
	0.45/0.47	0.47/0.50
	0.47/0.82	0.54/0.82

Bei diesen Flecken sollte es sich um Indolalkaloide handeln. Eine ebenfalls mit den gleichen Laufmitteln durchgeführte zweidimensionale DC mit der Yohimbinbase führte zu den Rf-Werten: 0.36/0.39. Berücksichtigt man geringe Veränderungen bei den chromatographischen Parametern (z.B. Kammersättigung, Laufmittelzusammensetzung) läßt sich Fleck 3 der oben aufgeführten Zusammenstellung Yohimbin zuordnen.

Ein weiterer Beweis für die qualitative Übereinstimmung beider Extrakte war die zweidimensionale DC eines Gemisches der beiden Extraktlösungen. Es zeigten sich keine weiteren Flecken und das Chromatogramm stimmte mit den Chromatogrammen der einzelnen Extrakte überein.

3. 3. Weitere Farbreaktionen von Yohimbin auf der DC-Platte mit (Bedingungen DC 3)

	Fröhde-Reagenz (D7)	Ammoniumvanadat (D8)	Phosphormolybdänsäure-Reagenz (D9)
Yohimbin:	graugrün	braun	gelb
Extraktlösung:	graugrün	braun	hellgelb

3.4. Hochdruckflüssigchromatographie

Für die HPLC-Analyse des Yohimbins wurden bei Anwendung der Gradientenelution ca. 45 Minuten benötigt. In den letzten 20 Minuten wurden die noch auf der Säule verbliebenen Substanzen (Nebenalkaloide, lipophilere Substanzen) eluiert. Nach ca. 15 Minuten Equilibrierungszeit konnte von neuem injiziert werden.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Yohimbin	11.60 $\pm$ 0.30	6.7
Valium [®]	16.98 $\pm$ 0.40	10.3

Ermittelte Werte: (n = 2)	Bezogen auf 100 mg Extrakt:
Extrakt 1:	2.19 mg
Extrakt 2:	3,41 mg
Extrakt 3:	1.22 mg
Extrakt 4:	1.17 mg
Extrakt 5:	3.09 mg
Extrakt 6	3.36 mg

Wiederfindung: 92.9%

Die Identifizierung des Yohimbinpeaks erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und der nach Zuspritzen von Yohimbin zu beobachtenden Peakerrhöhung. In gleicher Weise konnte auch das dem Yohimbin isomere Rauwolfscin identifiziert werden (Retentionszeit ca. 14 min, k' -Wert 8.3)

4. Experimenteller Teil

4. 1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen: 2 mg Rauwolfscin-HCl
2 mg Yohimbin-HCl
in je 10 ml 60 proz. MeOH gelöst

Probenaufbereitung

Je ca. 30 mg der 6 Extrakte wurden in 10 ml 60 proz. MeOH unter Ultraschall gelöst bzw. suspendiert. Die Extrakte 3 und 4 ergaben eine klare goldgelbe Lösung. Die Extrakte 1, 2, 5, 6 mußten filtriert werden. Das Filtrat war ebenfalls klar und goldgelb gefärbt.

Bedingungen:

Stat. Phase: DC 1-3: Kieselgel 60_F 254
DC 4 : Aluminiumoxid 60_F 254 Type E

Mobile Phase:	DC 1: Toluol/Essigester Diethylamin 40:35:25
	DC 2: CH_2Cl_2 /MeOH/ NH_3 85:14:1
	DC 3: Aceton/MeOH/Eis- essig 70:25:5
	DC 4: CHCl_3 /Essigester/ Diethylamin 70:15:15
Laufzeit/	DC 1: 50 min / 14 cm
Laufhöhe:	DC 2: 60 min / 13,4 cm
	DC 3: 45 min / 14,4 cm
	DC 4: 90 min / 12 cm
Detektion:	UV 254 nm, 366 nm Sprühreagenz: D 1
Auftragemenge:	10 μl

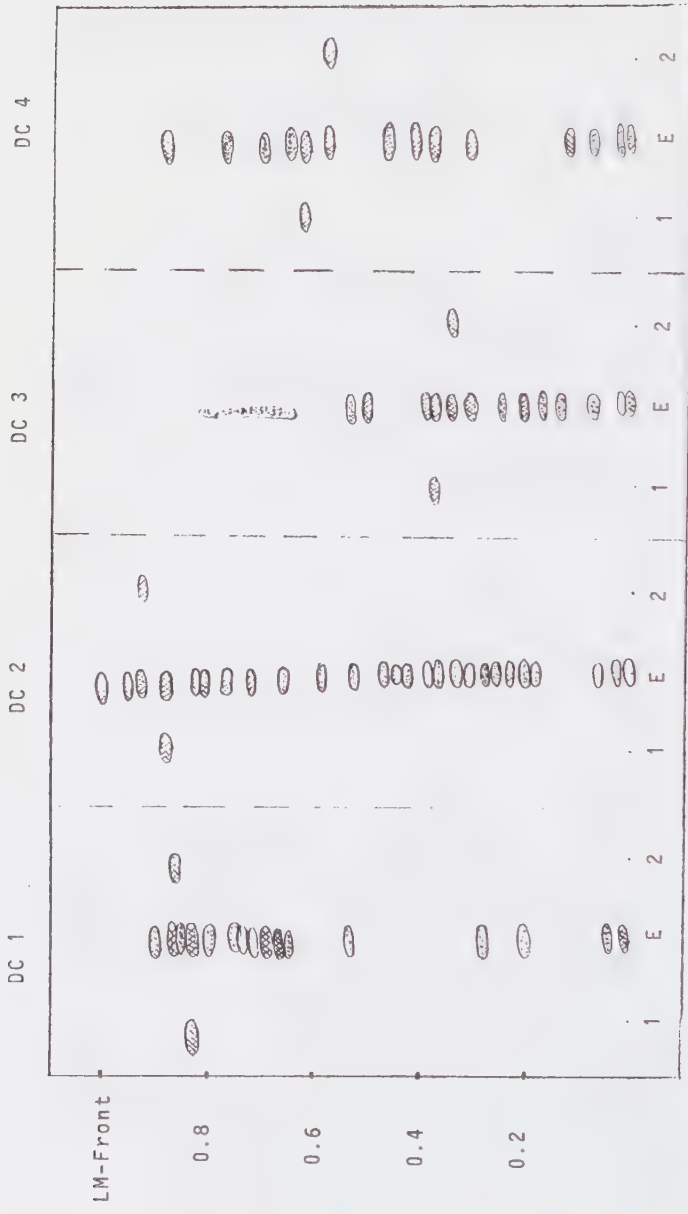


Abb. 1: Eindimensionale Dünnschichtchromatogramme von Yohimbe Extrakten (hier stets Extrakt 1 = E) mit 4 verschiedenen Laufmitteln mit 1 = Yohimbin und 2 = Rauwolfscin als Vergleichssubstanzen

4. 2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen: 2 mg Yohimbinbase in 10ml
Methanol (erhalten durch
Ausschütteln; aus dem Hydro-
chlorid-Salz)

Probenaufbereitung

Je ca. 200 mg der Extrakte 1 und 2 wurden in ca.
50 ml 20 prz. MeOH aufgenommen, mit Ammoniak (25%)
alkalisch gemacht. Anschließend wurde 3 x mit je
50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigt-
en Dichlormethan-Extrakte wurden am Rotationsver-
dampfer eingedampft und der Rückstand in Methanol
(10 ml) gelöst.

Von dieser Lösung wurde auf die DC-Platte aufge-
tragen.

Bedingungen:

Stat. Phase:	Kieselgel 60 F 254 nm
Mobile Phase:	1, Aceton/MeOH/Eisessig 70:25:5 2, CHCl ₃ /MeOH 7:3
Laufzeit:	1, 60 min 2, 40 min
Detektion:	UV 254 n, 350 nm Sprühreagenz: D1 und D6
Auftragemenge:	10 µl

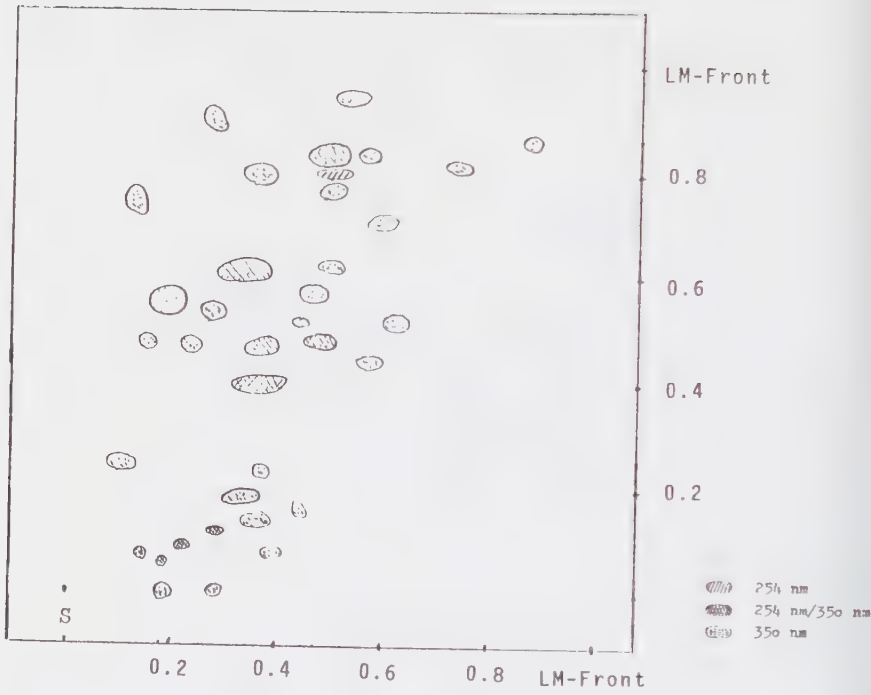


Abb. 2: Zweidimensionales DC vom Extrakt 1 mit
zwei verschiedenen Laufmitteln (Bedingungen
siehe S.31)

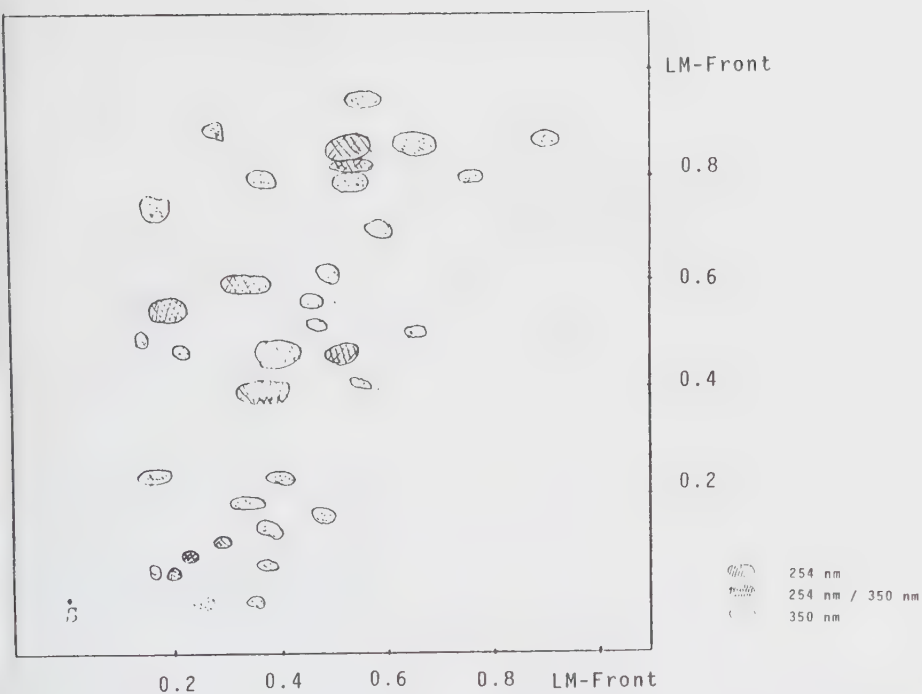


Abb. 3: Extrakt 2 (Bedingungen wie bei Abb. 2)

4. 3. Hochdruckflüssigchromatographie

Bestimmung von Yohimbin in den Extrakten 1-6:

Konz. der Eichlösung: 0.540 mg Yohimbin
 0.22 mg Valium[®]
 in 10 ml 60 proz. MeOH

Probenaufbereitung:

Je ca. 30 mg (genau gewogen) wurden mit 2 ml der Stammlösung des int. Standards und einigen ml 60 proz. MeOH versetzt und unter Ultraschall gelöst bzw. suspendiert. Anschließend wurde mit 60 proz. MeOH auf 10 ml aufgefüllt. Die Suspensionen wurden vor der Injektion durch ein Faltenfilter filtiert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4)
 + Vorsäule

Mobile Phase: Acetonitril / Triethylamin-
 Ammoniumformatpuffer 0.01 M
 pH 7.9

Gradient: Startbedingungen: 40% Acetonitril

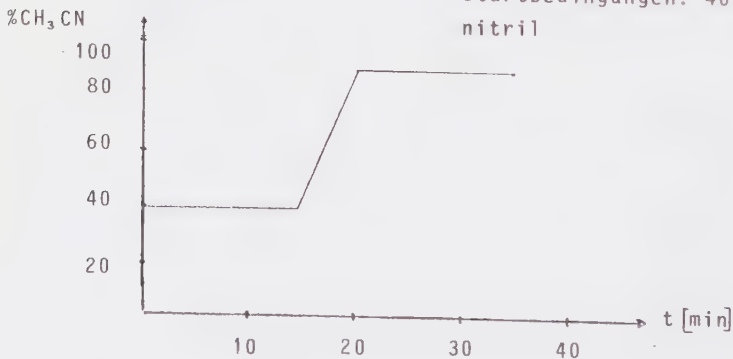


Abb.4: Gradientenverlauf: Prozentanteil Acetonitril in Abhängigkeit von der Zeit

Equilibrierungszeit:	10 min
Fluß:	0.9 ml/min
Papiervorschub:	0.25 cm/min
Detektion:	UV 254 nm / 0.005 AUFS
Integrator:	Attenuation 5, Tangentiale Peakauswertung (5 - 21 min)
Injektionsvol.:	10 µl

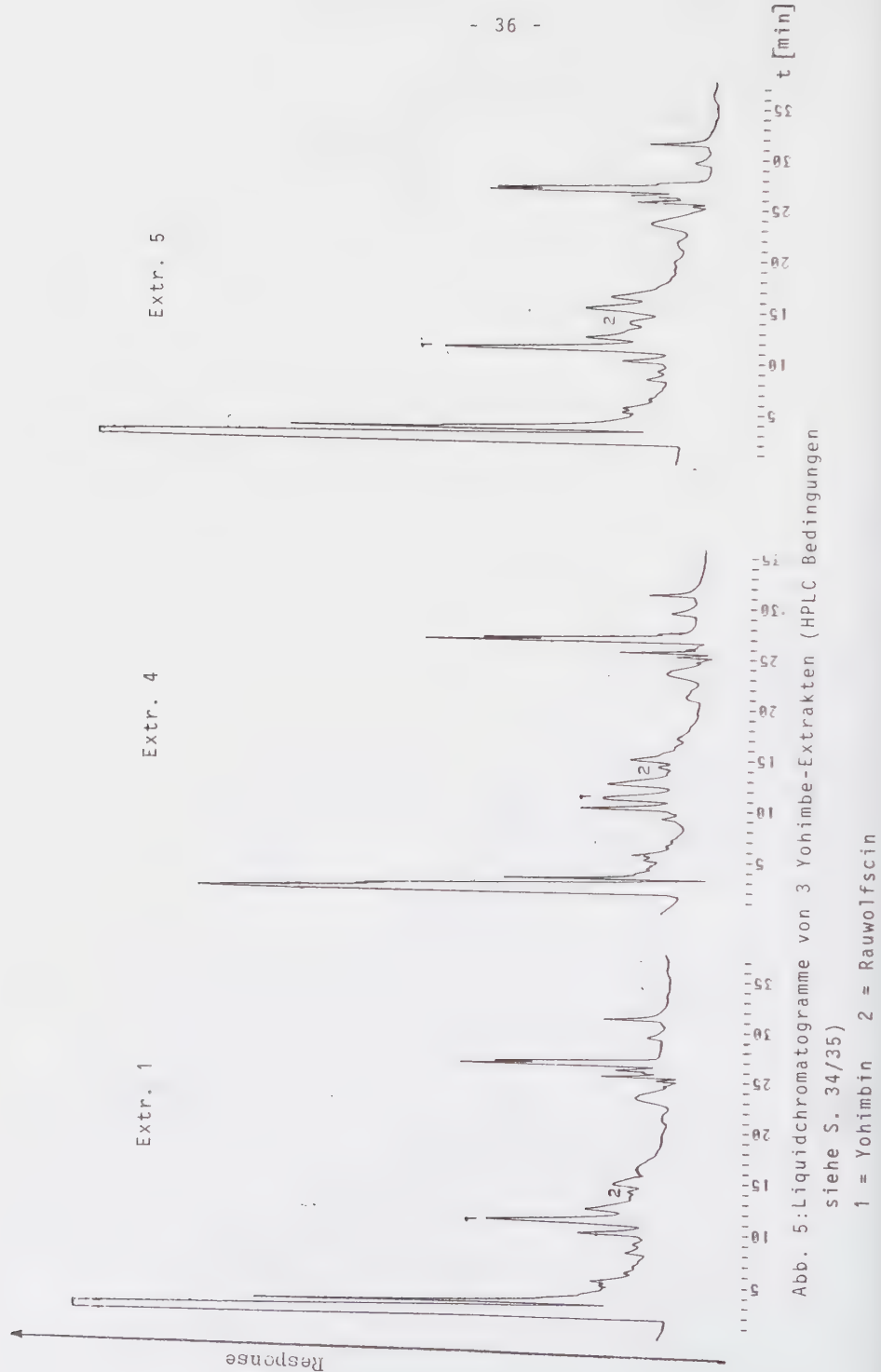


Abb. 5: Liquidchromatogramme von 3 Yohimbe-Extrakten (HPLC Bedingungen
siehe S. 34/35)
1 = Yohimbin 2 = Rauwolfscin

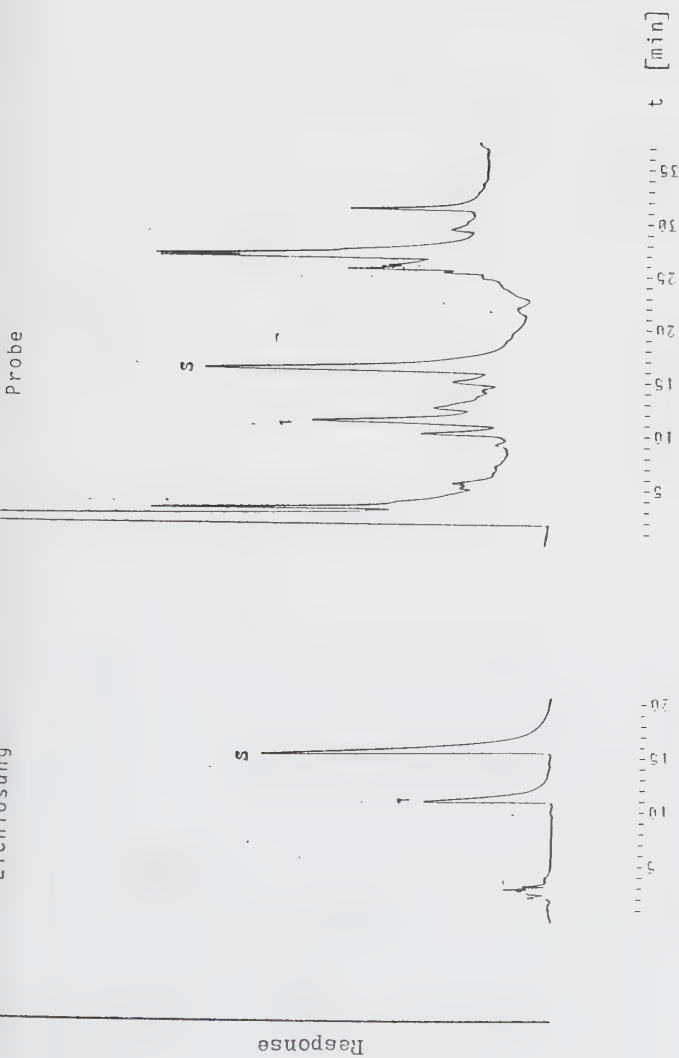


Abb. 6: Liquidchromatogramme der Eichlösung sowie der Yohimbe-Extrakt-Probe 1 unter Zusatz des internen Standards (Bedingungen wie Abb. 5)
1 = Yohimbin 2 = Valium[®]

4. 3. 1. Weitere Analysen von Yohimbe-Extrakten mit Hilfe der HPLC-Methode bei Verwendung einer anderen Säule oder eines anderen Laufmittels.

4. 3. 1. 1. C 18 reversed-phase Säule

Probe:

Yohimbe-Extrakt 2 in Methanol

Probenaufbereitung:

Über stark sauren Ionenaustauscher

(siehe Aufarbeitung S. 186)

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-18 (250-4)

Mobile Phase: Acetonitril/Triethylamin-

Ammoniumformiatpuffer

0.01 M pH 8.5

Gradient: Startbedingung: 20% Acetonitril

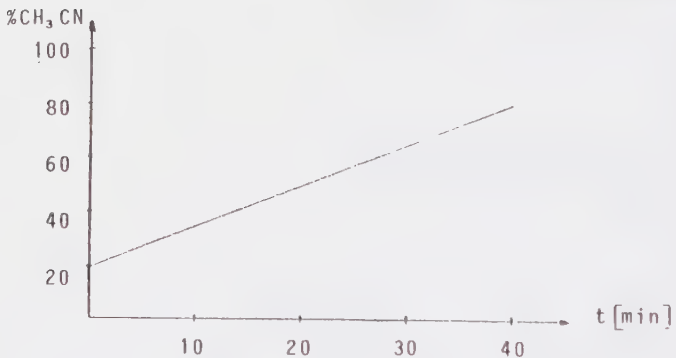


Abb. 7: Gradientenverlauf: Prozentanteil Acetonitril in Abhängigkeit von der Zeit

Fluß: 1.0 ml/min

Papiervor-

schub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 254 nm/0.02 AUFS

Injektions-

volumen: 30 µl

4. 3. 1. 2. Ionenpaarchromatographie

Probe: Yohimbe-Extrakt 5 in Methanol

Probenaufbereitung:

Es wurde über einen stark sauren Ionenaustausch gegeben. (siehe S. 159)

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4)

Mobile Phase: Acetonitril/Pentansulfonat-Natrium 0.01 M pH 3.5

Gradient: Startbedingungen: 63% Acetonitril

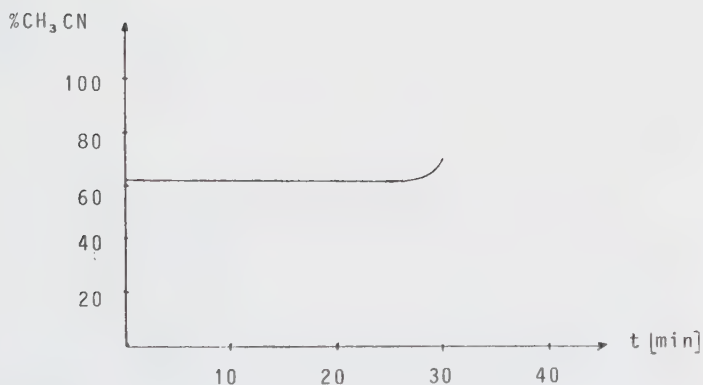


Abb. 8: Gradientenverlauf: Prozentanteil Acetonitril in Abhängigkeit von der Zeit.

Fluß: 2.0 ml/min

Papiervor-

schub: UV 254 nm / 0.01 AUFS

Injektions-

volumen: 30 µl

4. 3. 1. 3. Methanol anstelle von Acetonitril als Eluent.

Bedingungen und Liquidchromatogramm siehe Testasa S. 165

Beim Arbeiten mit Yohimbin ist besonders zu beachten:

Lösungen von Yohimbin und Yohimbe-Extrakten sollten möglichst schnell analysiert und im Dunkeln aufbewahrt werden, da Yohimbin lichtempfindlich ist und die Base sich in Tageslicht schon nach wenigen Stunden gelb färbt. Das gleiche läßt sich bei der Dünnschichtchromatographischen Entwicklung von Yohimbin beobachten.

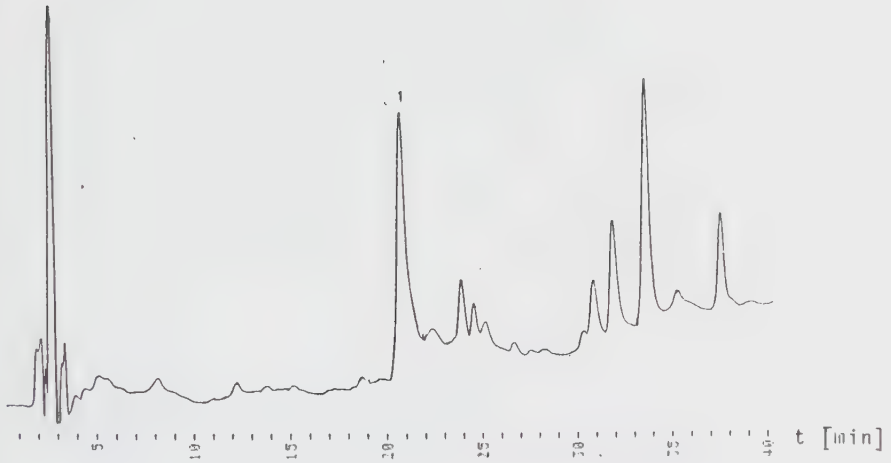


Abb. 9: Liquidchromatogramm von Yohimbe-Extrakt 2 auf einer RP-18 Säule (Bedingungen siehe 4.3.1.1.)
1 = Yohimbin

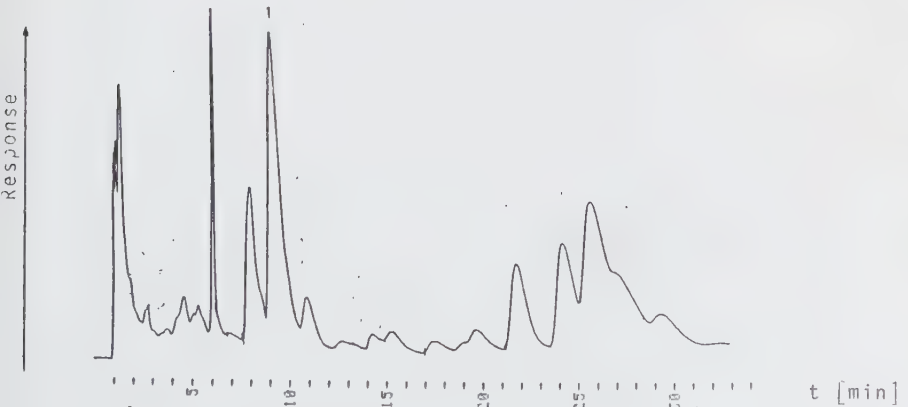


Abb. 10: Liquidchromatogramm von Yohimbe-Extrakt 5 mit einem Ionenpaarreagens als mobile Phase (Bedingungen siehe 4.3.1.2.) 1 = Yohimbin

Muira Puama-Extrakt (verschiedene Hersteller)

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Es gibt keine analytischen Untersuchungen über im Handel erhältliche Muira Puama-Extrakte; die Droge selbst wurde dünnschichtchromatographisch auf Steroide ^{19,21}), gaschromatographisch auf Fettsäuren geprüft ²⁰). Älteren Arbeiten zufolge soll die Droge ein Alkaloid enthalten ^{70,71}), was aber durch neuere Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte ⁷²). Hochdruckflüssigchromatographische Untersuchungen sind bisher nicht beschrieben worden.

2. Eigene Untersuchungen

Ich habe Muira Puama-Extrakte verschiedener Hersteller bzw. Extrakte, welche von pharmazeutischen Betrieben in ihren Arzneimitteln verwenden werden, untersucht.

2. 1. Liste der untersuchten Extrakte

(1) Extr. Muira Puama sicc.

CH. 1002 201

H. Finzelberg's Nachfolger, Andernach/Rhein

(2) Extr. Muira Puama

Analys.-Nr. KG 85459

Tiemann Arzneimittel, Lünen

(3) Extr. Muira Puama

A.Nr. 14169

Schwarzhaupt KG, Köln

(4) Extr. Muira puama e lign. sicc 10:1

Muster-Nr. 361/4

Birkenweg, Kleinostheim/Mainz

Bei keinem der Extrakte war ein Gehalt angegeben worden.

Die vier Extrakte zeigten hinsichtlich Farbe, Löslichkeit und qualitativer Zusammensetzung keinen Unterschied, so daß sich in meinen weiteren Ausführungen die Bezeichnung Muira Puama auf alle 4 Extrakte bezieht.

2. 2. Aussehen

ockerfarbenes Pulver

2. 3. Löslichkeit

H ₂ O:	gut löslich
EtOH (50%):	gut löslich
EtOH:	teilweise löslich
CHCl ₃ :	wenig löslich
n-Hexan:	nicht löslich

Obwohl die Droge schon lange bekannt ist, kann man weder Genaueres über Inhaltsstoffe erfahren, noch gibt es überprüfbare (und schon gar nicht überprüfte) Angaben zur Wirkung der Droge, Extrakten oder Fertig-arzneimitteln. Um die Droge in Fertig-arzneimitteln nachweisen und bestimmen zu können, habe ich nach einem Inhaltsstoff gesucht - einem Alkaloid oder einem Phytohormon.

Zu diesem Zwecke wurde der Drogenextrakt mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität extrahiert und die Extrakte wurden chromatographisch untersucht. Ich habe auf eine Vielzahl verschiedener Hauptwirkstoffgruppen geprüft: So wurde versucht, Hormone über ein Adsorberharz anzureichern und anschließend die Konzentrate zu untersuchen. Mit dem TAS-Ofen Verfahren habe ich nach charakteristischen flüchtigen basischen, sauren oder neutralen Komponenten bzw. Zersetzungsprodukten gesucht.

Dünnschichtchromatographisch wurde der gut wasserlösliche Extrakt auf charakteristische Zucker geprüft. Schließlich habe ich aus Dickschichtplatten Substanzen isoliert und mit Hilfe der DC, bzw. der HPLC analysiert und verglichen.

Im Muira Puama-Extrakt läßt sich eine Reihe niedermolekularer Zucker nachweisen. In Spuren findet man noch das häufig in Pflanzen vorkommende Steroid Sitosterin, sowie einige weitere nicht näher charakterisierte hydrophile Begleitsubstanzen. Diese Verbindungen sind aber auch im Yohimbe-Extrakt zu finden, so daß es nicht möglich war, mit einer Leitsubstanz den Muira Puama-Extrakt neben dem Yohimbe-Extrakt nachzuweisen - von einer quantitativen Bestimmung ganz zu schweigen.

Das in der Literatur erwähnte Alkaloid "Muira Puamin" ⁷⁰⁾, sowie das Steroid Lupeol ²¹⁾ waren trotz aller Bemühungen im Extrakt nicht nachzuweisen.

3. Ergebnisse

3. 1. Untersuchung von Muira Puama Inhaltsstoffen, die sich in Ethanol und Wasser gut lösen.

3. 1. 1. Vorproben (Aufarbeitung und Bedingungen siehe exp. Teil S. 53/54) ⁷³⁾

Der Etherauszug wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Ethanol gelöst.

Vorprobe auf Tannine: negativ

Vorprobe auf reduzierende Komponenten: positiv

Die EthanolLösung wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst.

Probe auf Polyuronsäuren: negativ

Probe auf reduzierende Komponenten: positiv

Probe auf Stärke: negativ

Da die Vorprobe auf reduzierende Komponenten positiv war, wurde nun auf Zucker untersucht:

3. 1. 2. Nachweis und Identifizierung von Zuckern (dünn-schichtchromatographisch)

Probenlösung: wässrig-ethanol. Extrakt

DC-System 1 (siehe exp. Teil S. 55)

	Rf-Wert	D 18
Vergleichssubstanzen		
Maltose	0.22	blau
Saccharose	0.25	graugrün
Galaktose	0.30	blau
Glucose	0.32	blau
Sorbose	0.35	gelb
Fructose	0.35	orange
Arabinose	0.38	grünlich
Xylose	0.44	grünlich
Ribose	0.44	grünlich
Muir Puama	0.01-0.04	blau
	0.06	blau
	0.08	blau
	0.14	blau
	0.22	blau
	0.33	blau
	0.35	orange
Yohimbe	0.01-0.04	blau
	0.06	blau
	0.08	blau
	0.14	blau
	0.22	blau
	0.33	blau
	0.35	orange

DC-System 2 (siehe exp. Teil S.56)

	Rf-Wert	D 20
Vergleichssubstanzen		
Glucose	0.33	grün
Fructose	0.43	hellbraun
Muira Puama	0.22	rötlich
	0.33	grün
	0.43	hellbraun
	0.74	hellbraun
	0.85	violett
Yohimbe	0.22	rötlich
	0.33	grün
	0.43	hellbraun
	0.74	hellbraun
	0.85	violett

Glucose, Maltose und Fructose konnten dünnschicht-chromatographisch sowohl im Muira Puama- als auch im Yohimbe-Extrakt nachgewiesen werden. Beide Extrakte zeigten in 2 verschiedenen DC-Systemen das gleiche Muster. Die nach der Detektion mit Sprühreagenz D 18 entstandenen blauen Flecken im unteren Rf-Bereich stammen von weiteren Disacchariden (z. B. Cellobiose).

Da die Muira Puama- und Yohimbe-Extrakte die gleichen Kohlenhydrate enthalten, ist eine Unterscheidung mit Hilfe dieser Substanzen nicht möglich.

3. 2. Zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung auf weitere Stoffgruppen ⁷⁴⁾ wurde wegen der Unterscheidung vom Yohimbe-Extrakt dieses in gleicher Weise aufgearbeitet und chromatographisch analysiert.

Im methanol. Auszug der Extrakte wurde geprüft auf:

Anthraglykoside: negativ

Nach Besprühen mit ethanol. KOH (D 12) konnte im Tageslicht keine Rot- bzw. Blaufärbung beobachtet werden.

Arbutin: negativ

Mit Berliner Blau Reagenz (D 13) war eine Blaufärbung im Tageslicht zu beobachten.

Bitterstoffe: negativ

Die Detektion mit Vanillin/ H_2SO_4 Reagenz (D 14) ergab keine Färbung.

Flavonoide: negativ

Nach Besprühen mit NST/PEG Reagenz (D 15) war eine Färbung im längerwelligen UV-Licht nicht zu beobachten.

Im Yohimbe-Extrakt waren im Gegensatz zum Muira Puama-Extrakt nach der chromatographischen Entwicklung viele Substanzen bei 254 nm und/bzw. 350 nm zu erkennen. Der Muira Puama-Extrakt zeigte nur 2 deutlich zu erkennende Flecken; ein Fleck (0.92) mit hellblauer Fluoreszenz (350 nm) und einer am Auftragepunkt, welcher bei beiden Wellenlängen zu sehen war.

Saponine: negativ

Mit der Butanolphase des methanol. Auszugs wurde mit Vanillin/ H_2SO_4 Reagenz (D 14) auf Saponine geprüft. Eine Färbung war nicht feststellbar.

DC-Bedingungen siehe exp. Teil S.56

Alkaloide: negativ

Der methanol.-wässrige Auszug wurde mit Ammoniak versetzt und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. In der organ. Phase war nach der DC-Entwicklung keine Orangefärbung mit Dragendorffs Reagenz (D 1) zu erkennen. Der Yohimbe-Extrakt zeigt mehrere Flecken mit Orangefärbung.

Herzglykoside: negativ

Probenaufbereitung: siehe exp. Teil S.57

Nach Besprühen mit Kedde Reagenz (D 16) ließ sich eine Färbung im Tageslicht nicht beobachten.

In einem CH_2Cl_2 -Auszug der Extrakte wurde nach dem Eindampfen und Aufnehmen in Toluol geprüft auf:

Valepotriate: negativ

Nach dem Besprühen mit einem HCl/Eisessig prüf-reagenz (D 17) war eine Färbung nicht zu beobachten.

Ätherische Öle: negativ

Sowohl der Muira Puama-Extrakt, als auch der Yohimbe-Extrakt zeigten nach dem Besprühen mit Vanillin/ H_2SO_4 Reagenz einen schwach rosafarbenen Fleck (0.16)

Cumarine: negativ

Nach dem Besprühen mit ethanol. KOH war keine zusätzliche Fluoreszenz bei 350 nm zu beobachten.

Der CH_2Cl_2 -Auszug des Extraktes weist nach der Entwicklung auf der Platte 3 Flecken auf: (Beding. siehe exp. Teil S. 58)

Rf-Wert	254 nm	350 nm
0.23	-	hellblau
0.29	+	-
0.68	+	-

Diese 3 Flecken können jedoch im Dichlormethan-
auszug des Yohimbe-Extraktes neben einer Viel-
zahl weiterer Flecken ebenfalls beobachtet wer-
den.

3. 3. Versuche einer Anreicherung von Steroiden aus
dem CH_2Cl_2 -Auszug des Muira Puama-Extraktes
mit Hilfe eines Adsorberharzes und anschließende
dünnschicht- und hochdruckflüssigchromatographische
Untersuchung ⁷⁵⁾.
(Genaue Aufarbeitung und chromat. Beding. siehe
exp. Teil S. 59)

Reversed-Phase DC

Nach dem Besprühen mit Liebermann-Burchards
Reagenz zeigte sich ein kräftig rosa gefärbter
Fleck (R_f 0.71) bei der Entwicklung des Eluats 3
der Anreicherung mit Adsorberharz. Dieser Fleck
war sowohl im R_f -Wert, wie auch in der Färbung
identisch mit dem als Vergleich aufgetragenen β -
Sitosterin.

Diese Substanz konnte dann auch mit Hilfe der
HPLC auf einer RP-Säule und durch Detektion mit
UV bei 205 nm sowohl durch Retentionszeitenver-
gleich, als auch durch Zuspritzen der Reinsubstanz
und der daraus resultierenden Peakerhöhung identi-
fiziert werden. (siehe exp. Teil S.61)

	Retentionszeit [min]
β -Sitosterin	9.68

Sitosterin konnte jedoch auch im Yohimbe-, sowie
im Cola-Extrakt nachgewiesen werden und kann dem-
nach nicht als Leitsubstanz verwendet werden.

3. 4. HPLC eines methanol. Auszugs auf einer reversed-phase Säule und Detektion bei 254 nm

Man erkennt viele kleine Peaks, die in Fertig-arzneimitteln jedoch unterhalb der Nachweisgrenze liegen. (Einwaage dieses Auszuges: 3 g Extrakt; durchschnittliche Menge im Arzneimittel: 10-20 mg Extrakt!) Außerdem werden sie meistens von Begleitstoffen anderer Extrakte überdeckt oder sind in diesen selbst enthalten. (chromat. Beding. siehe exp. Teil S. 62)

3. 5. HPLC einer Substanz, die aus einer Dickschichtplatte isoliert wurde

Der methanol. Auszug zeigte auf der Dickschichtplatte 3 Hauptzonen

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm
1	0.27	+	-
2	0.50	+	-
3	0.65	-	+

Zone 3 wurde von der Platte eluiert und hochdruckflüssigchromatographisch untersucht. Ein Yohimbe-Extrakt wurde in gleicher Weise behandelt und nach der chromatographischen Entwicklung die Zone des Rf-Bereichs 0.65 extrahiert und der Auszug dann ebenfalls hochdruckflüssigchromatographisch analysiert. Der in Zone 3 auftretende Muira Puama-Inhaltsstoff war auch im Yohimbe-Extrakt enthalten und somit als Leitsubstanz ungeeignet. (chromat. Beding. siehe exp. Teil S. 63)

3. 6. Dünnschichtchromatographische Untersuchung des Petroletherauszugs. (chromat. Beding. siehe exp. Teil S. 64)

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 2
Vergleichs-				
substanz				
ß-Sitosterin	0.30	-	-	rosarot
Lupeol	0.41	-	-	rosa
Muira Puama	0.11	-	-	grau
	0.15	-	-	grau
	0.27	-	-	grau
	0.30	-	-	rosarot
	0.40	-	hellblau	.
	0.48	+	-	-
	0.83	+	-	-

Auch im Yohimbe-Extrakt waren neben wenigen weiteren Substanzen die oben aufgeführten nachweisbar. Sitosterin (Rf 0.30) war im Yohimbe- wie auch im Cola-Extrakt zu erkennen. Lupeol konnte nicht nachgewiesen werden.

3. 7. Saure Hydrolyse

Der methanol. Auszug des Muira Puama-Extraktes wurde durch Erhitzen mit Schwefelsäure hydrolysiert und das Hydrolysat dünnschichtchromatographisch mit einem nicht hydrolysierten Auszug verglichen.

Ein Unterschied war nicht feststellbar. Es fehlten folglich hydrolysierbare Substanzen (z.B. Ester) im Extrakt.

3. 8. TAS-Ofen-Verfahren zum Nachweis leicht flüchtiger Substanzen (genaue TAS- und chromat. Bedingungen siehe exp. Teil S.67/68)

3. 8. 1. Mit Ammoniumcarbonat als Treibmittel zum Nachweis basischer Substanzen. Untersuchungsmaterial: Muira Puama-, Cola- und Yohimbe-Extrakte

Bei einer Ofentemperatur von 175°C zeigte nach der DC-Entwicklung nur der Cola-Extrakt eine Färbung mit Dragendorffs Reagenz (Coffein!) Bei Erhöhung der Temperatur auf 250°C trat eine starke Zersetzung und Verkohlung ein. Bei 220°C lieferte auch der Yohimbe-Extrakt auf der Platte eine positive Dragendorff Färbung bei mehreren Flecken, während beim Muira Puama-Extrakt eine solche Färbung ausblieb. Mit ethanol. Molybdato-phosphatlösung (D 9) zeigten bei einer Ofentemperatur von 220°C sowohl Yohimbe- als auch Muira Puama-Extrakte je 2 blaue Flecken auf gelblichen Untergrund (R_f 0.31 und 0.72). Auffallend war in beiden Extrakten ein rötlicher Fleck (350 nm) mit einem R_f -Wert von 0.62. Von den ebenfalls aufgetragenen Filtraten von Muira Puama- und Yohimbe-Extrakten in einem Gemisch aus Methanol und Dichlormethan zeigte ebenfalls nur der Yohimbe-Extrakt Flecken, die sich mit Dragendorffs Reagenz anfärben ließen.

3. 8. 2. Mit Stärke (15% H_2O) als Treibmittel zum Nachweis neutraler Substanz. Untersuchungsmaterial: Muira Puama- und Yohimbe-Extrakt.

Bei beiden Extrakten waren 2 Flecken zu beobachten, die im UV-Licht bei 350 nm hellblau erschienen.

3. 8. 3. Mit Malonsäure als Treibmittel zum Nachweis saurer Substanzen

Im oberen Rf-Bereich (- 0.8) zeigten sich bei beiden Extrakten bei 350 nm gelblich und bläulich fluoreszierende Flecken. Nach Besprühung mit Schweepes Reagenz (D 19) waren wiederum bei beiden Extrakten im Tageslicht 2 Flecken (0.52, 0.81) mit brauner Färbung auf weißem Untergrund zu beobachten.

Ergebnis:

Auch mit dem TAS-Ofen-Verfahren konnte eine geeignete Leitsubstanz für das Muira Puama-Extrakt nicht gefunden werden.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Untersuchung der Extrakte auf in Ethanol und Wasser gut lösliche Substanzen

4. 1. 1. Vorproben

Probenaufbereitung:

Je 11 g von Muira Puama- bzw. Yohimbe-Extrakt wurden am Soxhlet 2 Stunden mit 125 ml Ether extrahiert (Extraktion von Alkaloiden, Sterolen, Aglyconen etc.). Anschließend wurde das Extraktionsgut getrocknet und mit 50 ml Ethanol unter Rückfluß etwa 1 Stunde extrahiert. Dieser Extrakt wurde filtriert, eingeengt und mit Ethanol bis zur klaren Lösung aufgefüllt. Der nach dieser Extraktion verbleibende Rückstand wurde in so viel warmem Wasser gelöst, daß eine klare Lösung entstand.

Mit dem ethanol. Auszug:

a. Nachweis auf Tannine:

1 ml des Alkohol-Extraktes wurde mit 1 ml Wasser verdünnt und mit 3 ml Eisen-(III)-chloridlösung versetzt. Beim Auftreten einer schwarz-blauen oder grün-schwarzen Farbe besteht Verdacht auf Gallensäure-tannine oder Catecholtannine

b. Vorprobe auf reduzierende Komponenten:

1 ml des Alkohol-Extraktes wurde mit 1 ml Wasser verdünnt und mit 1 ml Fehling I/II erhitzt. Rotfärbung oder Abscheidung eines roten Niederschlages von Cu(I)oxid sind Hinweise auf reduzierende Substanzen.

Mit dem wässrigen Auszug:

a. Vorprobe auf Polyuronsäuren (Pektine, Schleimstoffe):

2 ml des wässrigen Auszugs wurden tropfenweise zu 10 ml Aceton bzw. Ethanol gegeben. Das Auftreten eines Niederschlages ist als Hinweis zu werten.

b. Vorprobe auf reduzierende Substanzen:
siehe oben ethanol. Auszug

c. Vorprobe auf Stärke:

1 ml des wässrigen Auszugs wurde mit 1-3 Tropfen Jod/Kaliumjodid-Lösung versetzt. Das Auftreten einer blauen Färbung ist ein Indiz der Stärke.

4. 1. 2. Dünnschichtchromatographischer Nachweis und Identifizierung von Zuckern

Vergleichslösungen:

Wässrige Lösungen der Zucker (0.1%)

Probenaufbereitung:

Je 4 g der Extrakte wurden unter Rückfluß 1h
mit 50 proz. EtOH erhitzt. Von diesem Filtrat
wurden 10 µl auf die Platte aufgetragen.

Bedingungen:

DC System 1

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 64:50:10

Laufzeit: 2 h

Laufhöhe: 17 cm

Detektion: D 18

Auftragemenge: 10 µl

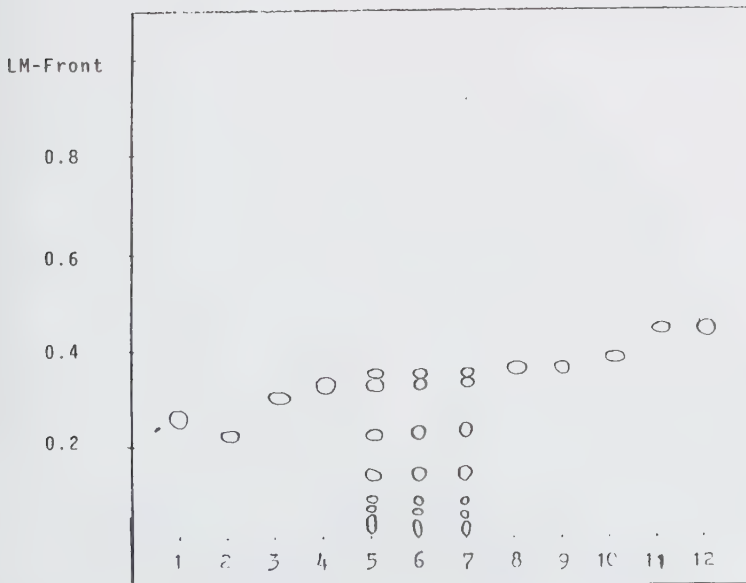


Abb. 11: DC von wässrig-ethanol. Auszügen des Muira Puama-(5) und Yohimbe-Extraktes(6), sowie eines Gemisches aus beiden Extrakten (7) und Vergleichssubstanzen.

1= Saccharose, 2= Maltose, 3= Galaktose,
4= Glucose, 8= Fructose, 9= Sorbose, 10= Arabinose,
11= Xylose, 12= Ribose

(Bedingungen siehe S. 55)

DC System 2

Stat. Phase: Cellulose F 254

Mobile Phase: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 64:50:10

Laufzeit: 1 h

Laufhöhe: 11 cm

Detektion: D 20

Auftragemenge: 10 μl

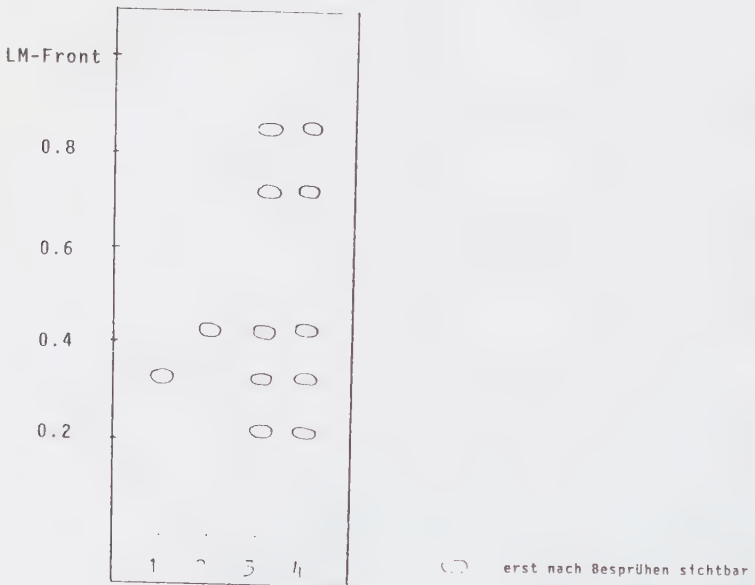


Abb. 12: DC von wässrig-ethanol. Filtraten des Muira Puama-(3) sowie Yohimbe-Extraktes(4) und zu den Vergleichssubstanzen.

1= Glucose, 2= Fructose (Bedingungen siehe oben)

4. 2. Dünnschichtchromatographische Prüfung auf Anthraglykoside, Arbutin, Bitterstoffe und Flavonoide

Probenaufbereitung:

Je 1 g Extrakt wurde mit 5 ml MeOH versetzt, 10 min mit Ultraschall behandelt und die Suspension filtriert.

Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: Ethylacetat/MeOH/H₂O 100:13,5:10

Laufzeit: 100 min

Laufhöhe: 15.5 cm

Detektion: Anthraglykoside D 12

Arbutine D 13

Bitterstoffe D 14

Flavonoide D 15

Auftrag-

menge: 16 µl, 60 µl

Prüfung auf Saponine

Probenaufbereitung:

Die methanol. Auszüge wurden einrotiert, in je 1 ml MeOH und 0.5 ml H₂O aufgenommen und mit 3 ml Butanol ausgeschüttelt. Nachdem noch je 1 ml Butanol zugegeben worden war (zur besseren Abtrennung), wurde die Butanolphase vor dem Auftragen auf die Platte noch im Vakuum konzentriert.

Bedingungen siehe oben

Detektion: D 14

Prüfung auf Alkaloide

Probenaufbereitung:

Je 1 g Extrakt wurde in 5 ml 50 proz. MeOH aufgenommen und mit 1 ml NH_3 (25%) und 5 ml CH_2Cl_2 versetzt. Dann wurde zweimal ausgeschüttelt und die vereinigten org. Phasen wurden im Vakuum einrotiert und in 1 ml CH_2Cl_2 gelöst.

Bedingungen siehe S. 57

Detektion: D 15

Prüfung auf Herzglykoside

Probenaufbereitung:

Je 1 g der Extrakte wurden in 5 ml 50 proz. MeOH suspendiert und nach Zugabe von 10 ml Bleiacetatlösung (10%) 10 min auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Filtrat zweimal mit je 10 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die vereinigten org. Phasen wurden eingedampft und der Rückstand in 1 ml CH_2Cl_2 / MeOH 1:1 gelöst.

Bedingungen siehe S. 57

Detektion: D 16

Prüfung auf Valepotriate, ätherische Öle und Cumarine

Probenaufbereitung:

Je 1 g Extrakt wurde mit 10 ml CH_2Cl_2 ca. 20 min unter Rückfluß erhitzt und dann das eingedampfte Filtrat in 1 ml Toluol gelöst.

Bedingungen:

Stat. Phase:

Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase:

Toluol-Ethylacetat 93:7

Laufzeit/Lauflänge:

90 min / 15,5 cm

Detektion:

Valepotriate D 17

Äther. Öle D 14

Cumarine D 12

Auftragemenge:

10 µl, 60 µl

4. 3. Anreicherung von Steroiden mit Hilfe eines Adsorberharzes und anschließende DC- und HPLC-Untersuchung

Herstellung einer Probenlösung:

5 g Muira Puama-Extrakt wurden 5 Stunden am Soxhlet mit ca. 100 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Anschließend wurden 20 ml der Extraktion einrotiert und in 3 ml 60 proz. EtOH aufgenommen. Das Filtrat wurde auf die Adsorberharzsäule gegeben.

Anreicherung:

- Säule mit EtOH (96%) vorwaschen und mit Vakuum absaugen
- Probenlösung mit einer Pipette auf die Säule bringen
- nach einigen Minuten mit 5 ml einer Na_2CO_3 -Lösung (0.1 proz. in 40 proz. EtOH) unter Anlegen eines Vakuums eluieren (= Eluat 1)
- anschließend mit 5 ml einer 0.1 proz. Salzsäure unter Anlegen eines Vakuums eluieren (= Eluat 2)
- anschließend mit 3 ml eines 96 proz. EtOH und dann mit 2 ml eines Gemisches aus Acetonitril und Isopropanol (7:3) unter Anlegen von Vakuum eluieren (= Eluat 3)

Eluat 3 wurde einrotiert und in 2 ml Acetonitril/Isopropanol (7:3) wieder gelöst.

Vergleichslösung für DC und HPLC: Ethanol
 β -Sitosterinlösung (0.1%)

4. 3. 1. Dünnschichtchromatographie

Bedingungen:

Stat. Phase: Nano-Sil C₁₈-50 UV₂₅₄
Mobile Phase: Isopropanol/Acetonitril 1:1
Laufzeit: 30 min
Laufhöhe: 7 cm
Detektion: UV 254 nm, 350 nm, Sprüh-
reagenz: D 2
Auftragemenge: 20 µl

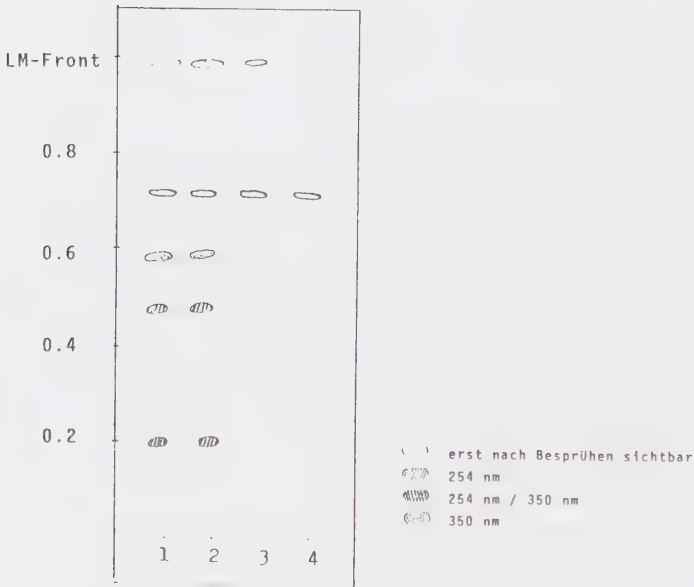


Abb. 13: DC eines CH₂Cl₂-Auszugs (1), einer wässrig-ethanol. Lösung (2) und Eluat 3 (3) des Muira Puama-Extrakte sowie einer Sitosterin Vergleichslösung (4)
Bedingungen siehe oben

4. 3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4) + Vorsäule

Mobile Phase: Acetonitril/Isopropanol 72:78

Fluß: 0.5 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 205 nm / 0.005 AUFS

Injektionsvol.: 20 µl



Abb. 14: Liquidchromatogramm von Eluat 3 der Phytohormon-anreicherung von Muira Puama über eine Adsorberharzsäule

Bedingungen siehe oben

S = Sitosterin

4. 4. HPLC eines methanol. Auszuges des Muira Puama-Extraktes

Probenaufbereitung:

3 g Muira Puama-Extrakt wurden ca. 30 min unter Rückfluß mit 60 ml MeOH extrahiert. Das Filtrat der Suspension wurde anschließend einrotiert und in 3 ml MeOH aufgenommen. Von dieser Lösung wurde ein Teil injiziert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4) + Vorsäule

Mobile Phase: 81 proz. MeOH

Fluß: 1 ml/min

Papiervor-

schub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 254 nm / 0.005 AUFS

Injektionsvol.: 30 µl

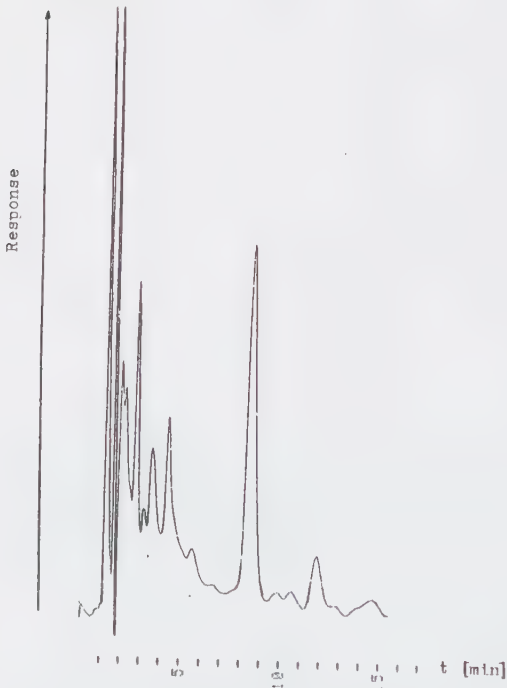


Abb. 15: Liquidchromatogramm des methanol. Auszugs eines Muira Puama-Extraktes (Bedingungen siehe oben)

4. 5. HPLC einer aus der Dickschichtplatte eluierten Substanz

Probenaufarbeitung:

siehe 4.4.

Bedingungen:

Stat. Phase:	PSC-Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5
Laufzeit:	2 h
Laufhöhe:	15 cm
Detektion:	UV 254 nm, 350 nm
Auftragemenge:	1 ml in Teilschritten, zwischendurch getrocknet

Elution:

Die bei 350 nm hellblau fluoreszierende Zone (R_f 0.65) wurde ausgekratzt und in ein Becherglas übergeführt. Anschließend wurde das Kieselgel mit 5 ml MeOH unter Ultraschall extrahiert und die Lösung durch zweimaliges Filtrieren vom Kieselgel abgetrennt. Von dieser methanol. Lösung wurde ein Teil in den Chromatographen injiziert.

Bedingungen:

Säule:	Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule
Mobile Phase:	95 proz. MeOH
Fluß:	0.5 ml/min
Papiervorschub:	0.5 cm/min
Detektion:	350 nm / 0.005 AUFS
Injektionsvol.:	50 µl

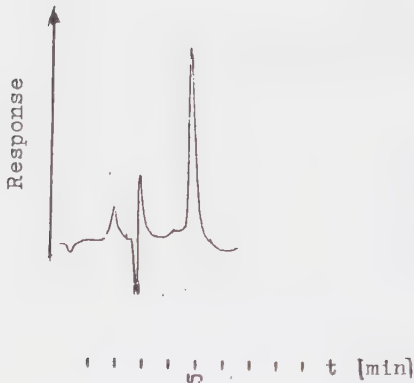


Abb. 16: Liquidchromatogramm einer dickschichtchromatographisch gewonnenen Substanz (Bedingungen und Gewinnung siehe S. 63)

4. 6. Dünnschichtchromatographische Untersuchung eines Petroletherauszuges

Aufbereitung:

1 g Muira Puama-Extrakt wurde 5 h am Soxhlet mit 100 ml Petrolether extrahiert. Der Soxhlet-Extrakt wurde anschließend auf ca. 10 ml mit dem Rotationsverdampfer eingengt.

Vergleichslösungen:

0.1 proz. Lösungen von β -Sitosterin und Lupeol in Dichlormethan.

Bedingungen:

Stat. Phase:	Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	Toluol/Aceton 95:5
Laufzeit:	50 min
Laufhöhe:	12 cm
Detektion:	UV 254 nm, 350 nm Sprühreagenz: D2
Auftragemenge:	Probe: 20 μ l
	Vergleichslösungen: 10 μ l

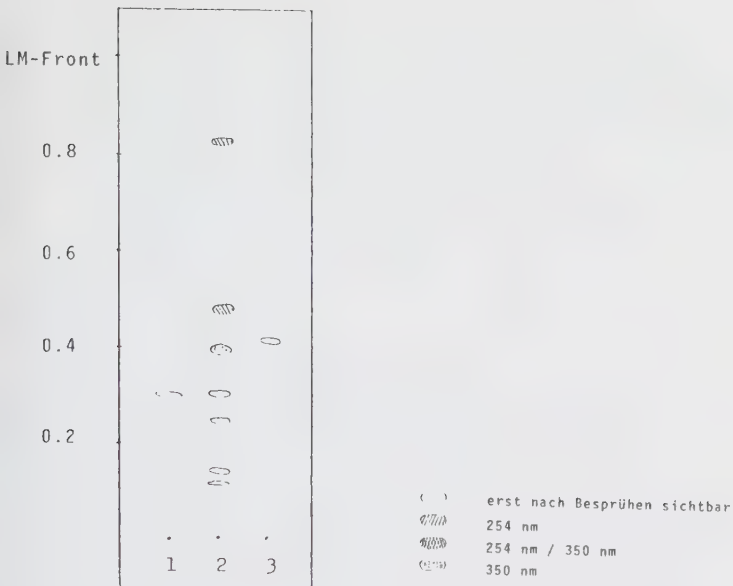


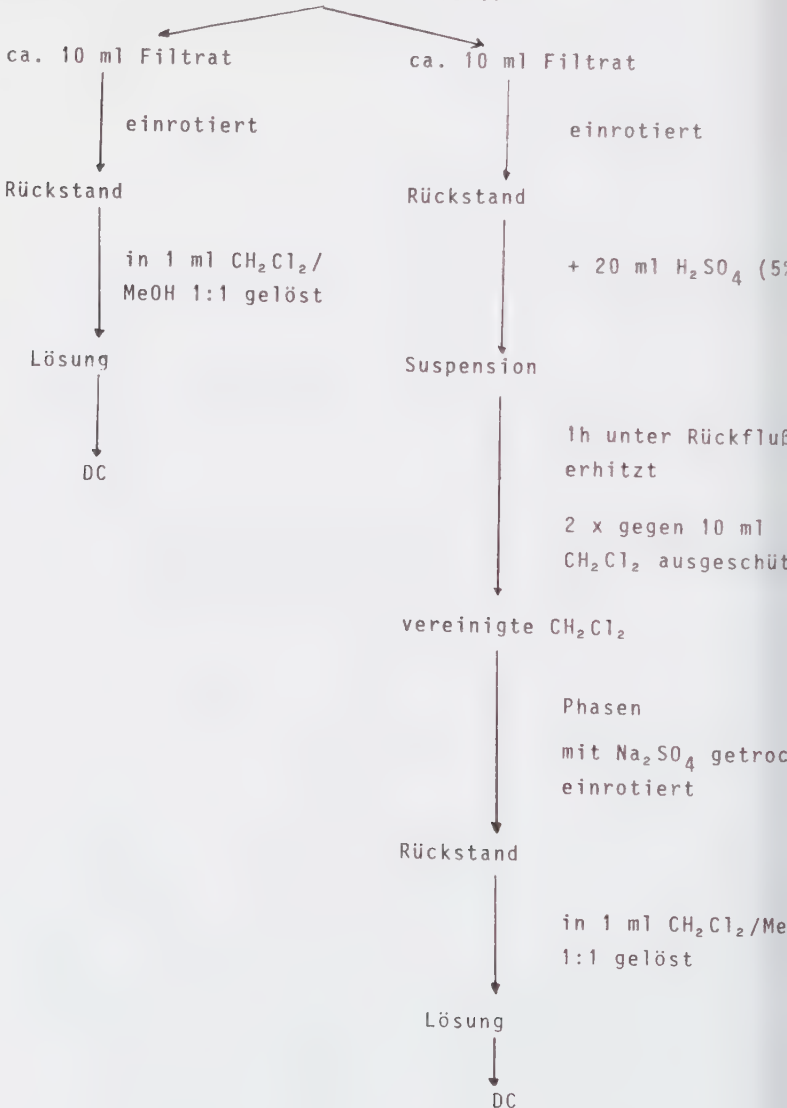
Abb. 17: DC des Petroletherauszuges eines Muira Puama-Extraktes (2) sowie von β -Sitosterin (1) und Lupeol (3) als Vergleichssubstanzen.
 Bedingungen siehe S. 64

4. 7. Saure Hydrolyse von Muira Puama

Probeaufbereitung:

1 g Muira Puama-Extrakt wurde 30 min mit 20 ml MeOH unter Rückfluß erhitzt.

Das erkaltete Filtrat wurde halbiert.



Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5
Laufzeit: 1 h
Laufhöhe: 15 cm
Detektion: UV 254 nm, 350 nm
Auftragemenge: 20 μl

4. 8. TAS-Verfahren

4. 8. 1. Allgemeines

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgelplatten mit unterschiedlichen Laufmitteln durchgeführt. Detektiert wurde im UV-Licht bei 254 und 350 nm.

Beim TAS-Ofen-Verfahren wurde stets die gleiche Menge Extrakt verwendet (50 mg). Die Verweildauer der Patrone im Ofen betrug 90 Sekunden (2 Bedampfungsflecken zu je 45 Sekunden).

Nachweis von basischen Substanzen

Treibmittel: Ammoniumcarbonat

Ofentemperatur: 175°C, 220°C

Mobile Phase der DC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ (25%)
85:14:1

Sprühreagenz: D 1

Nachweis von neutralen Substanzen

Treibmittel: Stärke (Wasseranteil: 15%)

Ofentemperatur: 175 °C

Mobile Phase der DC: n-Hexan/Essigester 70:30

Sprühreagenz: D 21

Nachweis von sauren Substanzen

Treibmittel: Malonsäure

Ofentemperatur: 220°C

Mobile Phase der DC: Isopropanol/H₂O/Eisessig
80:15:5

Sprühreagenz: D 19

Cola-Extrakt {verschiedene Hersteller}

1. Bisher beschriebene Analysenmethoden

1. 1. Purinbestimmung in unterschiedlicher Matrix

Es wurden Bestimmungen von Purinen mit Hilfe der HPLC auf polaren und unpolaren Säulen ²⁰⁾ in Schokolade ⁷⁶⁾, Plasma ⁷⁷⁻⁷⁹⁾, Urin ⁸⁰⁾ und Getränken ^{81,82)} durchgeführt.

1. 2. Purinbestimmung in Colasamen und Cola-Extrakten

Dünnschichtchromatographisch konnten die Purine aufgetrennt ⁸³⁻⁸⁵⁾ und das Coffein densitometrisch bestimmt werden ⁸⁶⁾. Auch säulenchromatographisch ließen sich die Purine abtrennen ⁸⁷⁾ und UV-spektroskopisch (jedoch meist nur als Summe) bestimmen ⁸⁸⁻⁹⁰⁾. HPLC-Verfahren zur Bestimmung der 3 Purine Coffein, Theobromin und Theophyllin wurden bisher nur auf polaren Säulen durchgeführt ⁹¹⁾. Reversed-phase Chromatographie beschränkte sich auf Abtrennung und Ermittlung des Coffeins ⁹²⁾.

2. Eigene Untersuchung

Ich habe 5 Extrakte unterschiedlicher Hersteller untersucht.

2. 1. Liste der untersuchten Extrakte

(1) Extr. Colae EB 6 sicc.
Nr. 80751072
ohne Gehaltsangabe
Caesar & Lorentz, Hilden

- (2) Extr. Colae e sem. sicc.
Muster Nr. 362/4
Gehaltsangabe: 12% Alkaloide
Birkenweg, Kleinostheim/Mainz
- (3) Extr. Colae
Analys.-Nr. KE 85465
ohne Gehaltsangabe
Tiemann Arzneimittel, Lünen
- (4) Extr. Cola sicc.
85.124
Gehaltsangabe: 12% Coffein
Flachsmann AG, Zürich
- (5) Extr. Colae spir. sicc. PH. HV.
Muster Nr. 224
ohne Gehaltsangabe
Haidle & Maier, Stuttgart

2. 2. Aussehen

Extrakt 1: Gelbbraunes Pulver vermischt mit
dunkelbraunen und schwarzen Partikeln
Extrakt 2: Gelbbraunes Pulver
Extrakt 3: Gelbbraunes Pulver
Extrakt 4: Gelbbraunes Pulver
Extrakt 5: Graubraunes Pulver

2. 3. Löslichkeit:

Die Extrakte 1 - 4 zeigten das gleiche Löslichkeitsverhalten:

Wasser:	sehr gut löslich
50 proz. EtOH:	sehr gut löslich
EtOH:	teilweise löslich
CHCl ₃ :	wenig löslich
n-Hexan:	unlöslich

Extrakt 5:

Wasser:	teilweise löslich
50 proz. EtOH:	gut löslich
EtOH:	teilweise löslich
CHCl ₃ :	wenig löslich
n-Hexan:	unlöslich

2. 4. Nachweis und Bestimmung

Dünnschichtchromatographie:

Die filtrierte Chloroformextrakte wurden auf Kieselgelplatten mit einem Dichlormethan/Ethanol-Gemisch als Laufmittel entwickelt. Detektiert wurde mit UV-Licht und Besprühen mit Dragendorffs-Reagenz. In allen Extrakten konnten die 3 Purine nachgewiesen werden.

Hochdruckflüssigchromatographie:

Die Bestimmung der 3 Purine gelang mit den wässrigen Lösungen der Extrakte 1-4 bzw. dem Extraktfiltrat 5 mit Hilfe eines internen Standards auf einer reversed-phase Säule; mobile Phase: Acetonitril/Wasser; Zeitbedarf: 12 min. Als interner Standard eignete sich Hydroxyethyltheophyllin. Die Detektion erfolgte im UV bei 254 nm. Der Gehalt an Coffein, Theobromin und Theophyllin war bei einigen Extrakten sehr unterschiedlich.

3. Ergebnisse

2. 1. Dünnschichtchromatographie

	Rf-Wert	UV 254 nm	366 nm	D1	D5
Reinsubstanzen					
Theobromin	0.26	+	-	+	+
Theophyllin	0.30	+	-	+	+
Coffein	0.47	+	-	+	+
Proben					
Extrakt 1	0.26	+	-	+	+
	0.30	+	-	+	+
	0.47	+	-	+	+
	0.62	-	d-blau	-	-
	0.79	-	h-blau	-	-
Extrakt 2	0.26	+	-	+	+
	0.30	+	-	+	+
	0.47	+	-	+	+
	0.80	-	h-blau	-	-
Extrakt 3	0.26	+	-	+	+
	0.30	+	-	+	+
	0.47	+	-	+	+
	0.70	-	gelb	-	-
	0.79	-	h-blau	-	-
Extrakt 4	0.26	+	-	+	+
	0.30	+	-	+	+
	0.47	+	-	+	+
	0.62	-	d-blau	-	-
Extrakt 5	0.26	+	-	+	+
	0.30	+	-	+	+
	0.42	-	h-blau	-	-
	0.45	-	h-blau	-	-
	0.47	+	-	+	+
	0.50	-	blau	-	-
	0.60	-	d-blau	-	-
	0.64	-	gelb	-	-
	0.70	-	gelb	-	-
	0.79	+	h-blau	-	-

Der Theobrominfleck ($R_f = 0.26$) war mit Ausnahme von 5 bei allen Extrakten weniger deutlich zu erkennen, als Theophyllin und Coffein, was durch die schlechtere Löslichkeit von Theobromin in CHCl_3 bedingt ist. Andererseits ließ sich das in sehr geringer Konzentration vorhandene Theophyllin bei der Extraktion mit CHCl_3 vollständig in Lösung bringen.

Die 3 Purine konnten in allen Extrakten sowohl durch R_f -Vergleich mit den Reinsubstanzen, als auch mit Dragendorffs Reagenz oder Besprühung mit Jod-Salzsäure (braune Färbung) eindeutig nachgewiesen werden.

3. 2. HPLC-Methode

Die drei Purine und der interne Standard konnten unter den angegebenen Bedingungen getrennt und auch von den hydrophileren Begleitsubstanzen (z.B. Phenolen) abgetrennt werden.

Die Analysenzeit betrug etwa 12 Minuten.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Theobromin	3.98 ± 9.94	3.0
Theophyllin	5.73 ± 0.04	4.7
Hydroxyethyltheophyllin (int. St.)	7.51 ± 0.10	6.5
Coffein	10.98 ± 0.05	10.0

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Extrakt 1:

Theobromin	Theophyllin	Coffein
$\bar{x} = 9.934 \text{ mg}$	$\bar{x} = 0.001 \text{ mg}$	$\bar{x} = 2.925 \text{ mg}$
$s = 0.006$	$s = 0$	$s = 0.0253$
VK= 1.76	VK= 0	VK= 0.86
% -Gehalt: 0.14% Theobromin		
0.004% Theophyllin		
12.34% Coffein		

Extrakt 2:

Theobromin	Theophyllin	Coffein
$\bar{x} = 0.024 \text{ mg}$	$\bar{x} = 0.011 \text{ mg}$	$\bar{x} = 3.167 \text{ mg}$
$s = 0.001$	$s = 0.005$	$s = 0.0346$
$VK = 4.16$	$VK = 4.54$	$VK = 1.09$
% - Gehalt: 0.092% Theobromin		
0.042% Theophyllin		
12.13% Coffein		

Extrakt 3:

Theobromin	Theophyllin	Coffein
$\bar{x} = 0.013 \text{ mg}$	$\bar{x} = 0.004 \text{ mg}$	$\bar{x} = 2.442 \text{ mg}$
$s = 0.005$	$s = 0.005$	$s = 0.0131$
$VK = 3.85$	$VK = 12.5$	$VK = 0.536$
% - Gehalt: 0.051% Theobromin		
0.016% Theophyllin		
9.61% Coffein		

Extrakt 4:

Theobromin	Theophyllin	Coffein
$\bar{x} = 0.0129 \text{ mg}$	$\bar{x} = 0.002 \text{ mg}$	$\bar{x} = 3.028 \text{ mg}$
$s = 0.0002$	$s = 0$	$s = 0.0342$
$VK = 1.55$	$VK = 0$	$VK = 1.13$
% - Gehalt: 0.052% Theobromin		
0.008% Theophyllin		
12.26% Coffein		

Extrakt 5:

Theobromin	Theophyllin	Coffein
$\bar{x} = 0.139 \text{ mg}$	$\bar{x} = 0.024 \text{ mg}$	$\bar{x} = 1.426 \text{ mg}$
$s = 0.0021$	$s = 0.00057$	$s = 0.0178$
$VK = 1.51$	$VK = 2.38$	$VK = 1.25$
% - Gehalt: 0.54% Theobromin		
0.093% Theophyllin		
5.51% Coffein		

Wiederfindung: Theobromin: 100.7%
Theophyllin: 97.4%
Coffein: 100.2%

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

wässrige Coffeinlösung (0.25%)

wässrige Theophyllinlösung (0.02%)

wässrige Theobrominlösung (0.01%)

Probenlösung:

Je 1.0 g Drogenextrakt wurde in 50 ml Chloroform nach 10 Minuten Ultraschallbehandlung filtriert und das klare Filtrat am Rotationsverdampfer einrotiert. Der Rückstand wurde in 1 ml Chloroform aufgenommen und die Lösung auf die DC-Platte aufgetragen.

Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 95:5

Laufzeit: 60 min

Laufhöhe: 16.5 cm

Detektion: UV 254 nm und 366 nm

Sprühreagenz: D 1, D 5

Auftragemenge: 30 μl

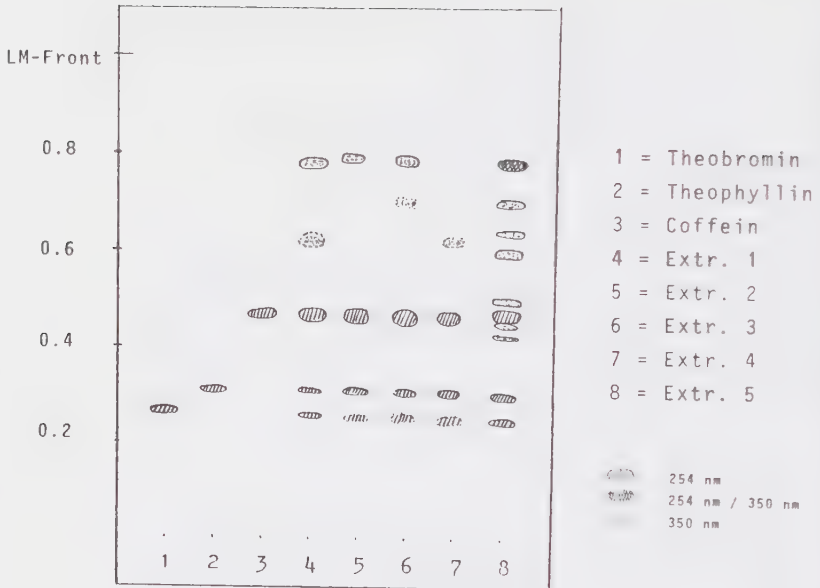


Abb. 18: DC der 5 untersuchten Cola-Extrakte und der Vergleichssubstanzen (Bedingungen siehe S. 75)

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Bestimmung von Theobromin, Theophyllin und Coffein

Konz. der Eichlösung:

0.0485 mg Theobromin

0.0428 mg Theophyllin

0.10 mg Hydroxyethyltheophyllin (int. Stand.)*

2.54 mg Coffein

in 10 ml H₂O

* 1,3 Dimethyl-7-[2-Hydroxyethyl]-xanthine

Probenaufarbeitung:

Etwa 25 mg Extrakt wurden, genau gewogen, nach Zusatz von 1 ml der Stammlösung des int. Standards (≈ 0.1 mg Hydroxyethyltheophyllin) und 5 ml H_2O mit Hilfe von Ultraschall gelöst bzw. suspendiert. Die Extrakte 1 - 4 ergaben eine klare, gelbe Lösung. Extrakt 5 eine Suspension, die filtriert werden mußte. Anschließend wurde mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

Genaue Einwaagen:

Extrakt 1: 23.7 mg
Extrakt 2: 26.1 mg
Extrakt 3: 25.4 mg
Extrakt 4: 24.7 mg
Extrakt 5: 25.9 mg

Bedingungen:

Säule:	Shandon ODS Hypersil 5 μm (125-4)
Mobile Phase:	Acetonitril: H_2O 8:92
Fluß:	0.8 ml/min
Papiervorschub:	0.25 cm/min
Detektion:	UV 254 nm / 0.005 AUFS
	ab 0.01 min Attenuation: 3
	ab 9.50 min Attenuation: 9

Besondere Integration:

ab 2.5 min bis 9.5 min
Tangentiale Peakauswertung

Injektionsvol.: 10 μl

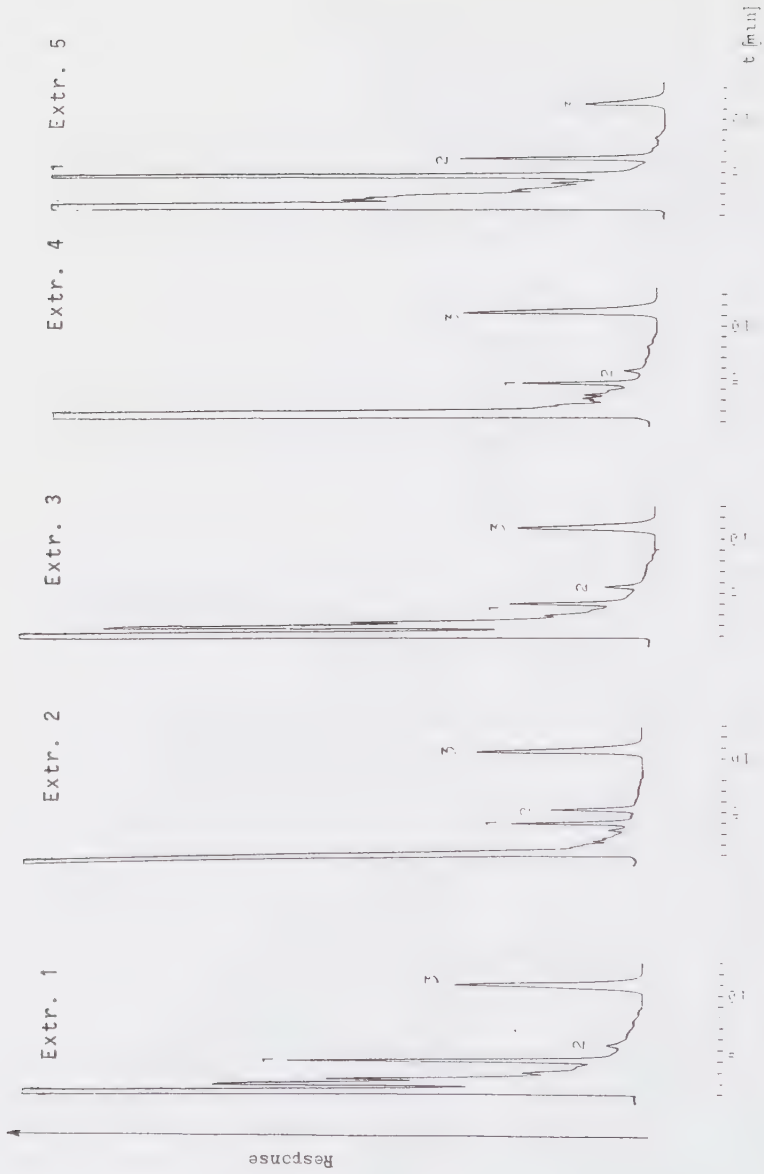


Abb. 19: Liquidchromatogramme der wässrigen Lösungen von 5 Cola-Extrakten mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisches als mobile Phase (Bedingungen siehe S. 77) 1 = Theobromin, 2 = Theophyllin, 3 = Caffein

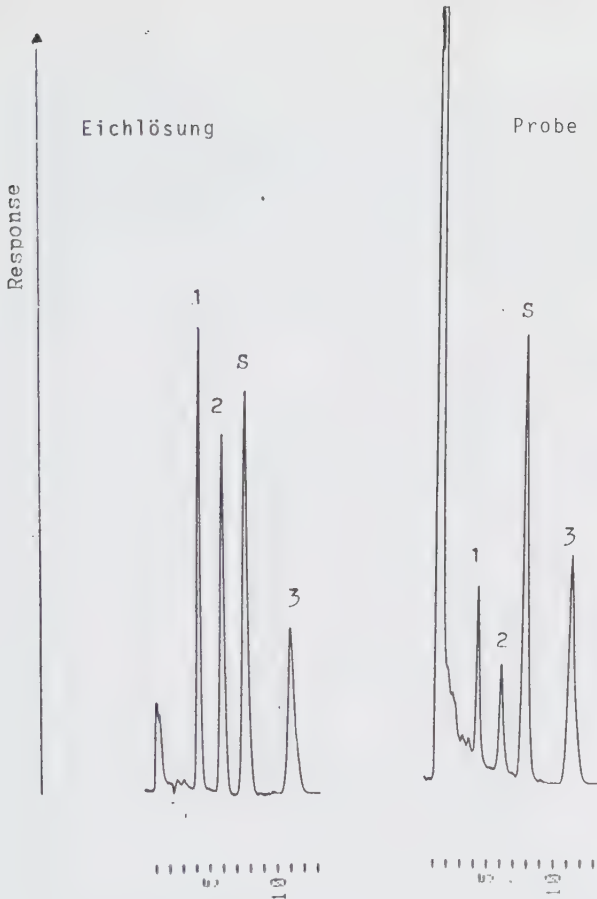


Abb. 20: Liquidchromatogramm der Eichlösung und des Cola-Extraktes 2

1 = Theobromin, 2 = Theophyllin, 3 = Coffein und
S = Hydroxyethyltheophyllin(int. Stand.)

Die übrigen Extrakte wurden in gleicher Weise
chromatographiert. (Bedingungen siehe S. 77)

Ignatius-Extrakt

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Strychnin bzw. die Strychnosalkaloide wurden auch in Drogen - meist in Nux Vomica - und Arzneizubereitungen spektralphotometrisch⁹³⁻⁹⁵⁾ oder mit papier-⁹⁶⁾, dünnsschicht-⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾ und gaschromatographischen^{101,102)} Methoden bestimmt. Darüberhinaus sind HPLC-Verfahren auf polaren¹⁰³⁻¹⁰⁸⁾ und reversed phase¹⁰⁹⁾ Säulen beschrieben worden.

2. Eigene Untersuchungen

Es wurde ein Extrakt, welcher noch in Fertigarzneimitteln verwendet wird, untersucht.

2. 1. Genaue Bezeichnung

Extr. Ignat. spir. sicc.

WE: E 02848906

Fa. Luitpold, München

2. 2. Aussehen

Dunkelbraun und zähflüssig

2. 3. Löslichkeit

H₂O: teilweise möglich

MeOH: gut löslich

50 proz EtOH: gut löslich

90 proz EtOH: teilweise löslich

CH₂Cl₂: unlöslich

n-Hexan: unlöslich

2. 4. Nachweis und Bestimmung

2. 4. 1. Dünnschichtchromatographie

Dazu wurde die methanol. Lösung des Extraktes auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und mit einem basischen Laufmittel entwickelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm sowie Besprühen mit Dragendorffs Reagenz.

2. 4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Strychnin und Brucin ließen sich auf einer RP-8 Säule mit einem Gemisch aus Acetonitril und einem sauren Phosphatpuffer als mobile Phase unter isokratischen Bedingungen bestimmen. Als interner Standard eignete sich Procain-HCl. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D1
Reinsubstanz				
Brucin	0.36	+	-	-
Strychnin	0.40	+	-	+
Probe	0.00	+	+	-
	0.31	+	-	+
	0.36	+	-	+
	0.40	+	-	+

Brucin und Strychnin konnten eindeutig zugeordnet und durch Besprühung mit Dragendorffs Reagenz als Alkaloide nachgewiesen werden. Bei dem Fleck mit einem Rf-Wert von 0.31 kann es sich aufgrund fehlender Absorption bei 350 nm und positiver Dragendorff Reaktion um ein Nebenalkaloid handeln. Der am Startpunkt zu beobachtende Fleck wird von pflanzlichen Begleitstoffen stammen.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Die Analysenzeit betrug ca. 25 Minuten. Eine Basislinientrennung konnte nicht erreicht werden. Geringere Elutionskraft der mobilen Phase führte bei längeren Analysenzeiten zwar zu einer besseren Trennung; jedoch zeigten dann die Peaks ein starkes Tailing und ließen sich nicht mehr quantitativ auswerten.

	Retentionszeit	[min]	k'-Wert
Procain-HCl	7.82	± 0.06	4.6
Strychnin	19.00	± 0.20	12.6
Brucin	21.38	± 0.30	14.3

Ermittelte Werte: (n=4)

- bezogen auf 100 mg Extrakt

Strychnin	Brucin
$\bar{x} = 3.61 \text{ mg}$	$\bar{x} = 3.57 \text{ mg}$
$s = 0.07047$	$s = 0.06800$
VK= 1.95	VK= 1.90

Wiederfindung: Strychnin 99.1%
Brucin 98.2%

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

- 1 proz. Lösung von Strychnin in MeOH
- 1 proz. Lösung von Brucin in MeOH

Probenaufarbeitung:

ca. 100 mg Extrakt im Ultraschallbad in 5 ml MeOH gelöst

Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F_{254}
Mobile Phase: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ (25%) 85:14:1
Laufzeit: 1 h
Laufhöhe: 16.6 cm
Detektion: UV 254 nm, 350 nm
Auftragemenge: 20 μl

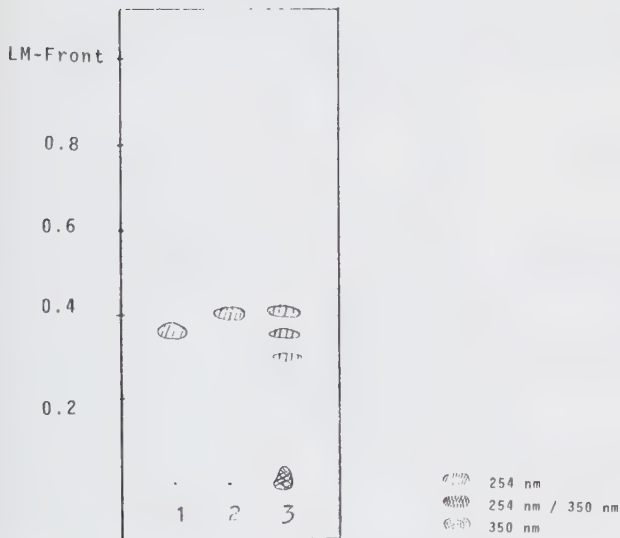


Abb. 21: DC von Ignatius-Extrakt und Vergleichssubstanzen
Bedingungen siehe oben

1 = Brucin, 2 = Strychnin, 3 = Ignatius-Extrakt

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Konzentration der Eichlösung:

1.15 mg Strychnin

1.06 mg Brucin

1.78 mg Procain-HCl (int. Stand.)

in 10 ml mobiler Phase

Probenaufbereitung:

ca. 30 mg Extrakt, genau abgewogen, wurde mit 2 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx 1,78$ mg Procain-HCl) versetzt; mit mobiler Phase auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend wurde im Ultraschall suspendiert und ein Teil abgefiltert.

Bedingungen:

Säule:	Lichrospher 100 RP-8 (125-4) + Vorsäule
Mobile Phase:	KH_2PO_4 -Puffer 0.005 M, pH 2.8 / Acetonitril 88: 12
Fluß:	0.8 ml/min
Papiervorschub:	0.25 cm/min
Detektion:	UV 254 nm/0.005 AUFS; Integrator: Attenuation 4
Injektionsvolumen:	10 μl

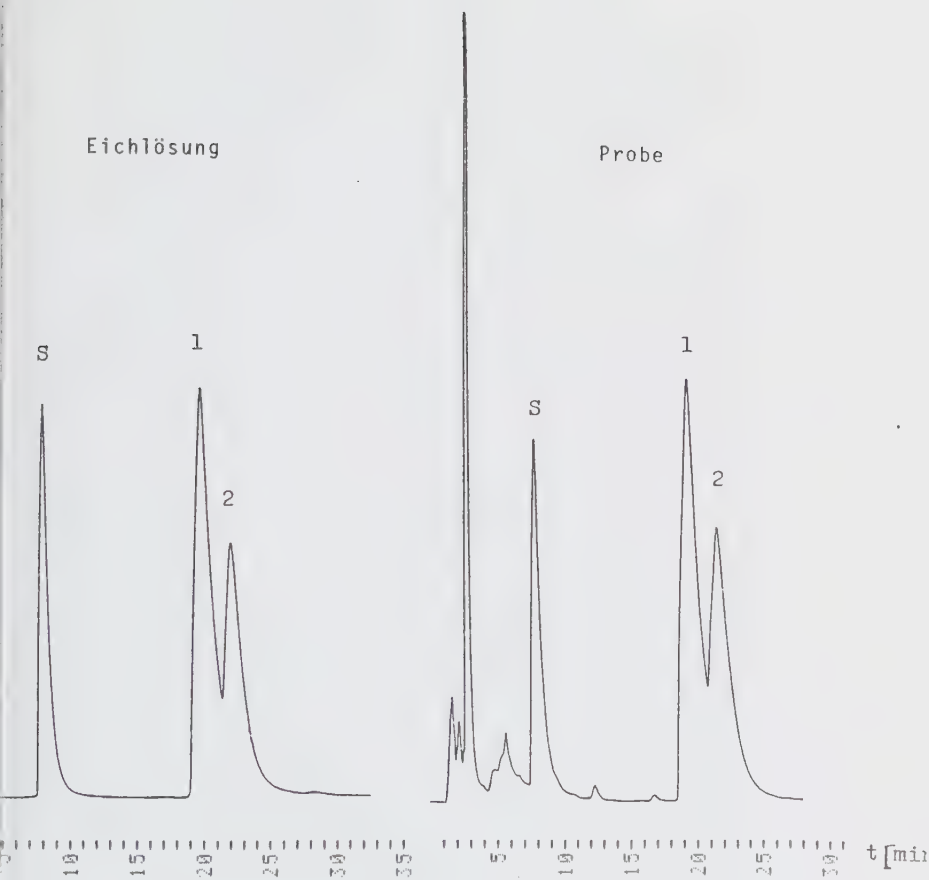


Abb. 22: Liquidchromatogramme der Eichlösung, sowie der Ignatius-Extraktprobe unter Zusatz des internen Standards. (Bedingungen siehe S.84)

1 = Strychnin, 2 = Brucin, S = Procain-HCl (int. Stand.)

Hopfen-Extrakt

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Bisher wurden dünnschichtchromatographische Verfahren zur Ermittlung der charakteristischen Hopfeninhaltsstoffe mit spezifischen Detektionsreagenzien (110-112), sowie die Bestimmung der Bitterstoffe mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie unter Verwendung polarer (113-114), oder unpolarer (115-117) Säulen beschrieben.

Auch der DC-Nachweis von Estron und Estradiol im Hopfen (32,33), sowie die estrogene Wirkung des Hopfen (34) wurden beschrieben; diese Angaben wurden jedoch angezweifelt (35).

2. Eigene Untersuchungen

Ich habe versucht, Estron und Estradiol im Ethylacetat- bzw. Dichlormethanauszug des Hopfen-Extraktes dünnschichtchromatographisch nachzuweisen. Die Auszüge wurden auf einer Kieselgelplatte mit einem Gemisch aus Ethanol und Dichlormethan chromatographiert und dann mit Liebermann-Burchards Reagenz detektiert. Hochdruckflüssigchromatographisch habe ich den Hopfen-Extrakt auf α - und β -Säuren untersucht, um so einen Fingerprint-Nachweis geringer Mengen Hopfen-Extrakt im Fertigarzneimittel (Okasagold^(R)) zu erhalten. Es wurde eine reversed-phase Säule und als mobile Phase ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Phosphorsäure verwendet. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 314 nm.

2. 1. Genaue Bezeichnung der Probe und der Vergleichsprobe

Extr. Humuli lupuli e flor. sicc.

Ch. 1771530

ohne Gehaltsangabe

H. Finzelberg's Nachfolger, Andernach/Rhein

Vergleichsprobe:

Hopfen-Extrakt (Standard)

Institut für Lebensmittelchemie und analytische
Chemie der TU München, Weihenstephan

Ich mußte zum Vergleich einen Extrakt heranziehen, da die sehr instabilen Reinsubstanzen nicht zur Verfügung standen. Von diesem, mit den Säuren angereicherten Extrakt, waren Elutionsreihenfolge sowie Retentionszeiten der Säuren unter bestimmten chromatographischen Bedingungen.

2. 2. Aussehen

Extr. Humuli Lupuli: helles rotbraunes Pulver

Vergleichslösung: dunkelgrüne zähflüssige Masse

2. 3. Löslichkeit

H₂O: teilweise

EtOH: teilweise

CH₂Cl: teilweise

n-Hexan: nicht

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

Die Vergleichslösungen von Estron (Rf 0.76) und Estradiol (Rf 0.57) zeigten eine orange Färbung

nach dem Besprühen, während in keinem der beiden Auszüge der Probe eine Färbung mit Liebermann-Burchard zu beobachten war.

Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen dieser Methode müssen sich im Hopfen-Extrakt, wenn überhaupt, weniger als 0.05 mg Estron bzw. Estradiol pro g Extrakt befinden.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Vergleich

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Cohumulon	10.80	3.1
Adhumulon + Humulon	13.00	3.9
Colupulon	17.40	5.6
Adlupulon + Lupulon	21.70	7.2

Probe :

Nach der angegebenen Methode ließen sich im Extrakt die α - und β -Säuren nachweisen und die den Humulonen und Lupulonen entsprechenden Peaks identifizieren. Adhumulon und Humulon sowie Adlupulon und Lupulon ergaben jeweils nur einen Peak. Eine vollständige Auftrennung von Adhumulon und Humulon bzw. Adlupulon und Lupulon würde etwa 90 min dauern ⁶⁾. Dies ist jedoch für eine Routineanalyse ein zu großer Zeitaufwand und zur Standardisierung nicht notwendig. Den Chromatogrammen zufolge befanden sich in der Probe noch weitere Substanzen, die in Form eines großen Peaks vor den Humulonenpeaks auftraten.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

0.001 proz. Estradiollösung in Ethylacetat

0.01 proz. Estronlösung in CH_2Cl_2

Probe:

2.0 g Hopfen-Extrakt wurde 2 h mit CH_2Cl_2 bzw. Ethylacetat am Soxhlet extrahiert. Das Extrakt wurde anschließend am Rotationsverdampfer auf 10 ml eingengt.

Bedingungen:

Platte: Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 100:5
Laufzeit/Laufhöhe: 40 min / 10.5 cm
Detektion: Sprühreagenz: D 2
Auftragemenge: 20 μl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Vergleichslösung :

ca. 50 mg des Vergleichs-Extraktes wurden in 10 ml MeOH unter Ultraschall suspendiert und dann filtriert.

Probenlösung:

200 mg Extrakt wurden am Soxhlet mit 180 ml Ether 3 h extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 5 ml MeOH suspendiert und dann filtriert.

Bedingungen:

Säule: Shandon ODS Hypersil 5 μ (125-4)
Mobile Phase: $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{PO}_4$ (85%) 85:17:0.25
Fluß: 0.5 ml/min
Papiervorschub: 0.3 cm/min
Detektion: UV 314 nm / 0.005 AUFS (Probe)
0.32 AUFS (Vergleich)
Injektionsvolumen: 10 μl

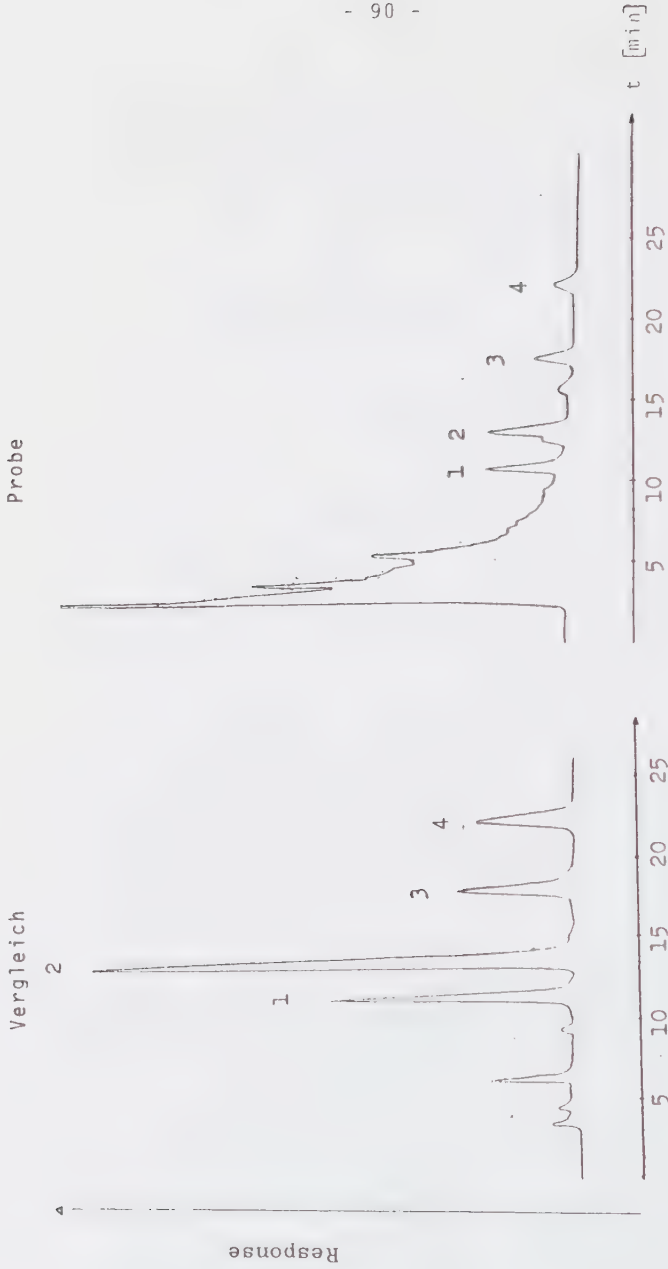


Abb. 23: Liquidchromatogramme einer Vergleichslösung und des Etherauszugs von Extr. Humuli Lupuli e flor. sicc. (Bedingungen siehe S. 89)
 1 = Cohumulon, 2 = Adhumulon + Humulon, 3 = Colupulon 4 = Adlupulon + Lupulon

Extrakte aus tierischem Material

(Cerebrum-, Testes- und Placenta-Extrakte)

1. Bisher beschriebene analytische Verhalten

Methoden zur Analyse der von mir untersuchten, durch Trocknung bzw. Sprühtrocknung erhaltenen Extrakte sind bisher nicht beschrieben worden.

2. Eigene Untersuchung

2. 1. Liste der untersuchten Extrakte

(1) Testes sicc. pulv.

Muster-Nr. 3221

Paninkret, Westerhorn

(2) Cerebrum sicc. pulv.

Muster-Nr. 3223

Paninkret, Westerhorn

(3) Placenta sicc. pulv.

Muster-Nr. 3224

Paninkret, Westerhorn

(4) Testes-Extraktpulver, sprühgetrocknet

Muster-Nr. 3225

Paninkret, Westerhorn

(5) Placenta-Extraktpulver

Muster-Nr. 3226

Paninkret, Westerhorn

(6) Testes sicc. pulv.

Ch K 14236

Biokanol, Höchstädt

(7) Cerebrum sicc. pulv.

Muster-Nr. 13159

Biokanol, Höchstädt

2. 2. Aussehen

Durch Sprühtrocknung erhaltene Extrakte: hellgelb; durch Trocknung erhaltene Extrakte (sicc. pulv.): gelb

2. 3. Löslichkeit

	Extr. sicc. pulv.	Extr. sprühgetr.
H ₂ O	teilweise	gut
EtOH	teilweise	teilweise
CH ₂ Cl ₂	teilweise	wenig
n-Hexan	nicht	nicht

Die durch Trocknung hergestellten Extrakte (Extr. sicc. pulv.) lösten sich in gleicher Weise.

Die Testes- bzw. Cerebrum-Extrakte der beiden Hersteller zeigten keinen Unterschied. Deshalb kann ich bei der Beschreibung meiner Untersuchung auf eine getrennten Nennung verzichten.

2. 4. Nachweis von Inhaltsstoffen und Vergleich der Extrakte untereinander mit dünnschichtchromatographischen und hochdruckflüssigchromatographischen Methoden.

2. 4. 1. Dünnschichtchromatographie

Dichlormethan- bzw. Ethylacetat-Auszüge der Extrakte wurden auf Sexualhormone (Estradiol und Progesteron in Placenta-Extrakten, Testosteron in Testes-Extrakten, sowie Cholesterin in Cerebrum-Extrakten) geprüft. Zur Detektion auf der Platte diente Liebermann-Burchards Reagenz oder Dinitrophenylhydrazin (Progesteron).

Die Nachweisgrenzen der Hormone wurden für diese Methode festgelegt. Wässrige Auszüge der Extrakte wurden vor und nach dem Hydrolyisieren durch Entwicklung auf Kieselgelplatten und Besprühen mit Ninhydrin Reagenz auf Unterschiede im Aminosäure- bzw. Peptidmuster analysiert. In Cerebrum-Extrakten wurde auf die Anwesenheit von Taurin von γ -Aminobuttersäure geprüft.

2. 4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Nach der Dansylierung wurden Cerebrum- und Testes-Extrakt auf Unterschiede bei freien Aminosäuren untersucht (Fingerprint-Analyse). Dazu wurde eine reversed-phase Säule und ein Gemisch von Acetonitril und einem KH_2PO_4 -Puffer als mobile Phase mit Gradientenelution verwendet. Detektiert wurde bei 254 nm. Auch auf Cholesterin wurden alle Extrakte mit einer reversed-phase Säule geprüft; hier wurde 95 proz. Methanol als mobile Phase und ein Refraktometer zur Detektion verwendet.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

3. 1. 1. Versuche zum Nachweis von Hormonen in Extrakten und Festlegung der Nachweisgrenzen; Besprühung mit Liebermann-Burchards Reagenz oder Dinitrophenylhydrazin ¹¹⁸⁾.

	Rf-Wert	D 2	D 3
Vergleichssubstanzen			
Estradiol	0.42	orange	
Testosteron	0.55	rot	
Cholesterin	0.60	rosa	
Progesteron	0.80		orange

Proben	Rf-Wert	D 2	D 3
Placenta sicc. pulv. (Ethyl- acetat-Auszug)	0.61	rosa	-
Cerebrum sicc. pulv. (CH ₂ Cl ₂ - Auszug)	0.60	rosa	-
Testes sicc. pulv. (CH ₂ Cl ₂ - Auszug)	0.61	rosa	-

Die sprühgetrockneten Extrakte zeigten keine Färbung.

Nachweisgrenzen: (folgende Mengen zeigten noch eine Färbung)

Cholesterin:	0.5 µg
Testosteron:	0.5 µg
Estradiol:	0.5 µg
Progesteron:	0.5 µg

Demnach enthalten die Extrakte Hormonmengen, die geringer sein müssen als die hier angegebenen Mengen:

- 0.1 mg Estradiol / g Placenta-Extrakt
- 1.0 mg Progesteron / g Placenta-Extrakt
- 1.0 mg Testosteron / g Testes-Extrakt

Mit Ausnahme der sprühgetrockneten Extrakte konnte in allen Extrakten Cholesterin nachgewiesen werden. Dem Vergleich der DC-Flecken zufolge befindet sich die größte Menge Cholesterin in den Cerebrum-Extrakten.

1. 2. Dünnschichtchromatographischer Vergleich
der Extrakte mit Hilfe der Peptidmuster ¹¹²⁾

Probe: wässrige Auszüge der Extrakte

Detektion: Ninhydrin Sprühreagenz

Ninhydrinpositiv Rf-Wert	Placenta	Cerebrum	Testes
0.01	gelborange	gelborange	gelborange
0.10	orange	orange	orange
0.26	rot	rot	rot
0.29	rotbraun	rotbraun	rotbraun
0.31	rot	rot	rot
0.35	rosa	rosa	rosa
0.41	orange	orange	orange
0.49	rosa	rosa	rosa
0.62	rotbraun	rotbraun	rotbraun
0.65	rot	rot	rot
0.74	rot	rot	rot
0.86	rosa	rosa	rosa
0.97	rosa	rosa	rosa

Auch die sprühgetrockneten Extrakte zeigten das gleiche Muster, die Farben der Flecken waren jedoch etwas intensiver. Die Extrakte unterschiedlicher Herkunft ließen sich demnach weder durch die Anzahl der Flecken, noch durch deren Färbung unterscheiden.

1. 3. Versuch zum Nachweis der im Gehirn vorkommenden
freien Aminosäure γ -Aminobuttersäure und Taurin
im Cerebrum-Extrakt ¹²⁰⁾

Die dünnschichtchromatographische Analyse zeigte, daß weder Taurin (Rf 0.78) noch γ -Aminobuttersäure (Rf 0.40) im Cerebrum-Extrakt vorkommt.

3. 1. 4. Vergleich der Hydrolysate von Testes- und Cerebrum-Extrakten

Nach der dünnschichtchromatographischen Entwicklung und Besprühen mit Ninhydrin waren Unterschiede bei Rf-Werten oder Fleckenfarben nicht zu beobachten.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Dansylierung von Cerebrum- und Testes-Extrakten ¹²¹⁾

Bei dieser Fingerprint Analyse konnten Unterschiede bei den Chromatogrammen der beiden Extrakte nicht festgestellt werden. γ -Aminobuttersäure befand sich nicht im Cerebrum-Extrakt. Dies konnte durch Vergleich der Retentionszeiten mit einer dansylierten Reinsubstanz sowie durch ihr Zuspritzen zum Extrakt bewiesen werden.

Nach diesem Verfahren waren Unterschiede, die zum Nachweis oder einer quantitativen Bestimmung der beiden Extrakte nebeneinander geeignet gewesen wären, nicht auffindbar.

3. 2. 2. Nachweis von Cholesterin

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Cholesterin	4.30 ± 0.05	2.7

In allen durch Trocknen erhaltenen Extrakten (in Testes-, Placenta- und Cerebrum-Extrakten) konnte Cholesterin nachgewiesen werden, das demnach als Leitsubstanz für Cerebrum nicht geeignet ist. (siehe auch 3.1.1.)

In sprühgetrockneten Extrakten war dagegen Cholesterin nicht nachweisbar.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

4. 1. 1. Versuche zum Nachweis von Hormonen

Vergleichslösungen:

Je 100 mg Testosteron, Progesteron und Cholesterin wurden in 10 ml CH_2Cl_2 , 100 mg Extradiol in 100 ml Ethylacetat gelöst. Von diesen Stammlösungen wurden dann Verdünnungen hergestellt: 0.1%, 0.01%, 0.001%

Je 1.0 g Extr. Testes sicc. und Extr. Cerebrum sicc. wurde 2 h am Soxhlet mit CH_2Cl_2 , Extr. Placenta sicc. mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurden die Auszüge am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit CH_2Cl_2 bzw. Ethylacetat auf 10 ml aufgefüllt.

Mit den sprühgetrockneten Extrakten wurde ebenso verfahren.

Je 5 μl der Vergleichslösungen und der Verdünnungen, sowie der Probenlösungen wurden auf die Platte aufgebracht.

Bedingungen:

Platte:	Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	$\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 7.5 : 100
Laufzeit:	1 h
Laufhöhe:	13 cm
Detektion:	Sprühreagenz: D 2, D 3 (Progesteron)
Auftragemenge:	20 μl

4. 1. 2. Vergleich der Extrakte anhand des Peptid-musters

Probenaufarbeitung:

Je 1.0 g Extrakt wurde in 25 ml H₂O gelöst (sprühgetrocknete Extrakte ergaben eine klare Lösung) bzw. suspendiert. Die Suspensionen wurden dann filtriert.

Bedingungen:

Platte: Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase: BuOH/H₂O/Eisessig 12:5:3
Laufzeit: 5 h
Laufhöhe: 13.5 cm
Detektion: Sprühreagenz: D 22
Auftragemenge: 20 µl

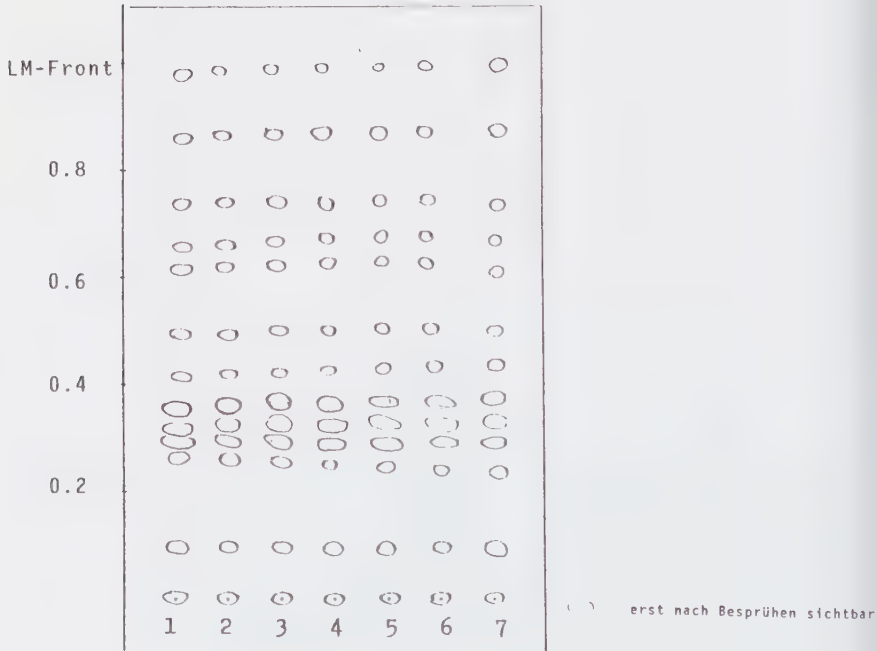


Abb. 24: DC der wässrigen Auszüge der aus tierischen Material hergestellten Extrakte (Bedingungen siehe oben)

1. 3. Versuch des Nachweises von γ -Aminobuttersäure und Taurin in Cerebrum-Extrakten

Vergleichslösungen:

0.1 proz. Lösungen von Taurin und γ -Aminobuttersäure in 80 proz. MeOH

Probenaufbereitung:

50 mg Extr. Cerebrum sicc. wurden in 10 ml 80 proz. MeOH unter Ultraschall suspendiert und dann filtriert.

Bedingungen:

Stat. Phase:	Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	70 proz. EtOH
Laufzeit:	3 h
Laufhöhe:	15 cm
Detektion:	Sprühreagenz: D 22
Auftragemenge:	10 μ l

1. 4. Vergleichende Untersuchung der Hydrolysate von Extr. Cerebrum sicc. und Extr. Testes sicc.

Probenaufbereitung:

Je 700 mg der Extrakte wurden mit 2.8 g Thio- glykolsäure und 70 ml 6 N HCL versetzt und 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Darauf- hin wurde filtriert und das Filtrat am Rotations- verdampfer auf ca. 20 ml eingengt.

Bedingungen siehe 4.1.2.

2. Hochdruckflüssigchromatographie

2. 1. Dansylierung von Testes- und Cerebrum-Extrakt

Vergleichssubstanz:

γ -Aminobuttersäure (GABA)

Derivatisierung der Vergleichssubstanz:

20.8 mg GABA wurden mit 0.5 ml 0.1 M NaHCO_3 Puffer (pH ca. 10.5) und 0.5 ml einer Dansyl-chloridlösung (15 mg / 1 ml Aceton) versetzt. Anschließend wurde die Suspension 2 Stunden unter Rückfluß mit aufgesetzten CaCl_2 Rohr bei 40°C gerührt. Dann wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 2 ml MeOH versetzt. Diese Suspension wurde dann durch eine mit Glaswolle gefüllte Pasteurpipette filtriert. Das klare Filtrat wurde in den Chromatographen injiziert

Probenaufbereitung:

Je 60 mg der Extrakte wurden mit 4.5 ml 0.1 M NaHCO_3 Puffer und 1.5 ml der Dansylchloridlösung versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Vergleichssubstanz.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4) + Vorsäule
Mobile Phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer 0.01 M pH 6.7
Gradient: Startbedingungen 15% CH_3CN

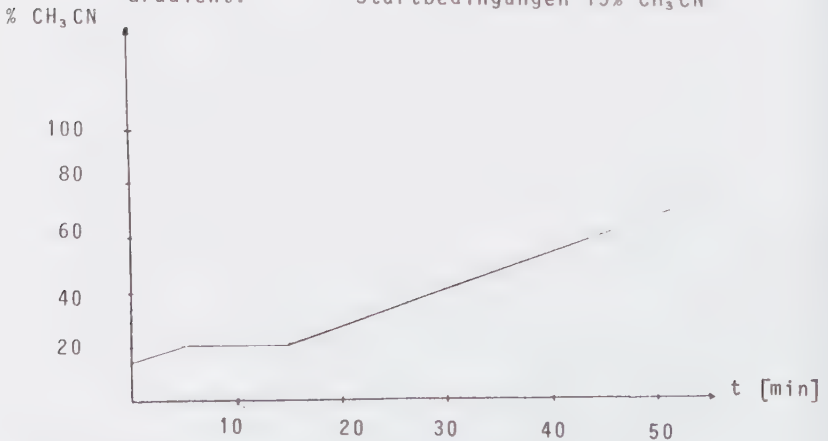


Abb. 25: Gradientenverlauf: Prozentanteil Acetonitril in Abhängigkeit von der Zeit

Fluß: 1.0 ml / min
Papiervorschub: 0.2 cm / min
Detektion: UV 254 nm / 0.005 AUFS
Injektionsvol.: 60 µl

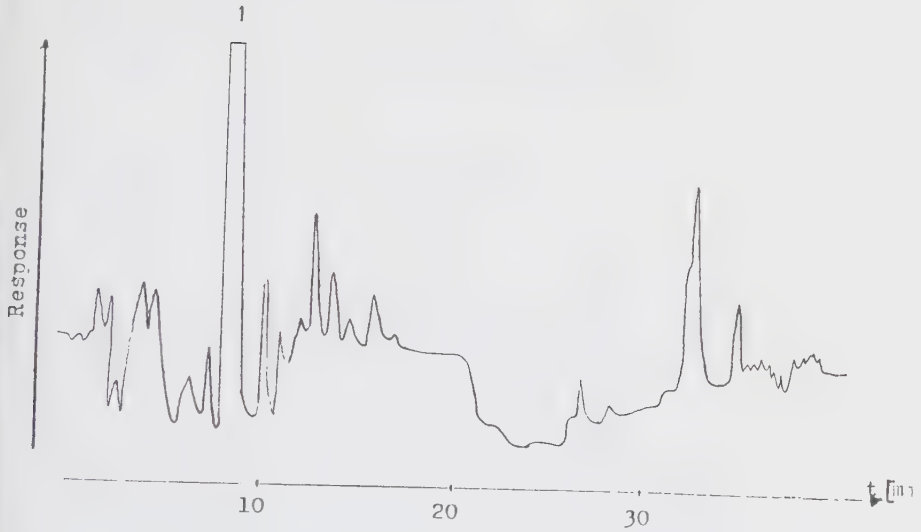


Abb. 26: Liquidchromatogramm eines dansylierten Testes-
Extrates. 1 = Überschuß an Dansylchlorid
(Das Chromatogramm des Cerebrum-Extraktes ist
nahezu identisch) (Bedingungen siehe S.100)

4. 2. 2. Nachweis von Cholesterin

Vergleichslösung:

1 proz. Lösung von Cholesterin in CH_2Cl_2

Probenlösung:

Aufarbeitung der Extrakte siehe 4.1.1.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule
Mobile Phase: 95 proz. MeOH
Fluß: 1.00 ml/min
Papiervorschub: 0.5 cm/min
Detektion: Differenzialrefraktometer
Attenuation 8x
Injektionsvol.: 10 µl

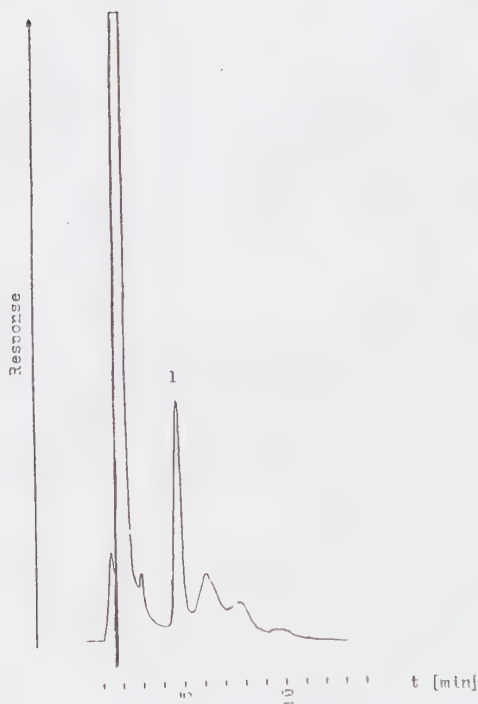


Abb. 27: Liquidchromatogramm eines CH_2Cl_2 -Auszugs von
Extr. Cerebrum sicc. 1 = Cholesterin
(Bedingungen siehe oben)

Analyse von Fertigarzneimitteln

a) Arzneimittelpräparate nur mit Reinsubstanzen

Yohimbin Spiegel ^(R) (Kali Chemie)

Aussehen:

weiße Tabletten, mit ca. 9 mm Durchmesser

Wirkstoff pro Tablette:

Yohimbin-HCl 5 mg (nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher beschriebene analytische Verhalten

Yohimbin wurde in Tabletten spektralphoto-
metrisch nach Umsetzung mit Methylorange
bestimmt ⁶¹⁾ oder nach Dehydrierung zu 3,4-
Dehydroyohimbin fluorimetrisch erfaßt ⁶²⁾.

Neben dünn-schichtchromatographischen Me-
thoden ^{53-59, 122)} wurde Yohimbin auch schon
mit dem HPLC-Verfahren auf unterschiedliche
Säulen analysiert ^{65-67, 123)}.

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Das Filtrat der wässrigen Suspension einer
Tablette wurde auf einer Kieselgelplatte
aufgetragen. Es wurde mit einem basischen
Laufmittel entwickelt. Die Detektion er-
folgte unter UV-Licht sowie mit Dragen-
dorffs Reagenz.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie:

Das Yohimbin ließ sich auf einer reversed-phase Säule mit einem Gemisch aus Acetonitril und dem Ionenpaarreagenz Pentansulfonat als mobile Phase und UV-Detektor eindeutig nachweisen und genügend genau bestimmen. Als interner Standard eignete sich Oxedrinartrat.

2. 3. Photometrie:

Die Bestimmung von Yohimbin erfolgte durch Vergleich der UV-Kurven der Probenlösung mit einer Eichlösung im Wellenlängenbereich von 205 - 295 nm.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm
Reinsubstanz			
Yohimbin-HCl	0.58	+	+
Probe	0.58	+	+

Der bei der Analyse und der Reinsubstanz auftretende Fleck zeigte bei 254 nm eine Fluoreszenzlöschung bei 350 nm eine hellblaue Färbung. Nach dem Besprühen mit Dragendorffs Reagenz ließ sich bei beiden Flecken eine orange Färbung auf hellgelben Unterlagen beobachten.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Yohimbin und der int. Standard sind basisliniengetreunt. Ein höherer Fluß beeinflusst weder die Trennung noch das Ergebnis, führt aber zu kürzeren Analysenzeiten.

Retentionszeit [min] k'-Wert

Oxedrinar-

trat(int.St.) 5.44 $\pm$ 0.02 5.8

Yohimbin-HCl 13.92 $\pm$ 0.04 16.4

Beide Proben ergeben die gleichen Ereignisse trotz unterschiedlicher Aufarbeitung. (siehe exp. Teil S. 106)

Ermittelte Werte:

(n = 5)

$\bar{x}$ = 5.26 mg

s = 0.012

VK= 0.23

Wiederfindung: 100.8%

3. 3. Photometrie

Ermittelte Werte:

(n = 6)

$\bar{x}$ = 5.11 mg

s = 0.105

VK= 2.05

Wiederfindung: Einwaage einer Analyse entsprechend etwa der Menge Yohimbin-HCl einer Tablette. Bestimmung mit gleichen Parametern wie die Probe. 99.6%

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösung:

50 mg Yohimbin-HCl in 50 ml H₂O

Probe:

Eine im Mörser zerkleinerte Tablette wurde in 5 ml H_2O unter Ultraschall suspendiert und filtriert. Das Filtrat zeigte Opaleszenz.

Bedingungen:

Stat. Phase:	Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	$CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$ (25%) 85:14:1
Laufzeit:	1 h
Laufhöhe:	14 cm
Detektion:	UV 254 nm und 350 nm
	Sprühreagenz: D 1
Auftragemenge:	20 μl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Konz. der Eichlösung:

9.94 mg Oxedrintartrat

4.82 mg Yohimbin-HCl in 50 ml H_2O

Probenaufarbeitung:

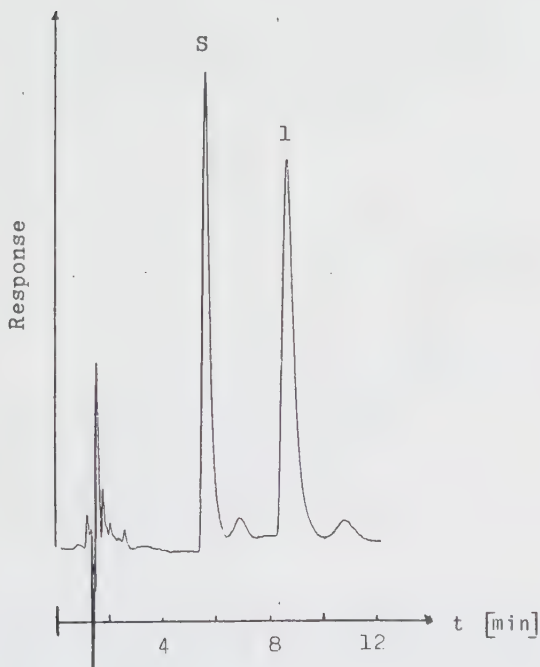
Eine im Mörser zerkleinerte Tablette wurde unter Ultraschall in ca. 20 ml H_2O bzw. 50 proz. EtOH suspendiert mit 5 ml der Stammlösung des int. Standards ($\cong$ 9.94 mg Oxedrintartrat) versetzt und mit H_2O zu 50 ml aufgefüllt. Ein Teil davon wurde filtriert.

Die ethanolische Lösung war klar und filtrierbar; das Filtrat der H_2O Lösung zeigte Opaleszenz.

Bedingungen:

Säule:	Lichrosorb RP-8 (250-4)
Mobile Phase:	Acetonitril/Pentansulfonat
	Natrium 0.01 M 8:2

Fluß: 2.0 ml/min bzw. 1.2 ml/min
Papiervorsch. 0.5 cm/min
Detektion: UV 272 nm/0.005 AUFS
Injektionsv.: 30 µl



28: Liquidchromatogramm einer Yohimbin-Spiegel Tablette zur Bestimmung von Yohimbin

1 = Yohimbin, S = Oxedrintartrat

(Bedingungen siehe S. 106)

4. 3. Photometrie

Probenaufarbeitung:

Eine im Mörser zerkleinerte Tablette wurde in 50 proz. EtOH unter Ultraschall suspendiert, nachgewaschen und zu 100 ml mit 50 proz. EtOH aufgefüllt.

Vergleichslösung:

Aufarbeitung wie bei der Probe

Bestimmung:

Die UV-Kurven von Proben und Vergleichslösung wurden mit Hilfe eines Rechenprogramms verglichen und ausgewertet.

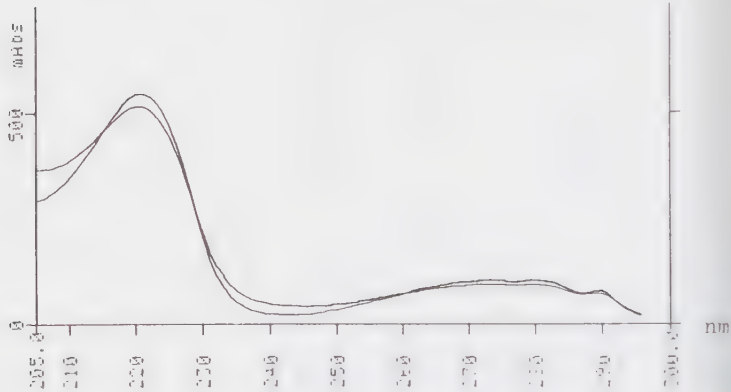


Abb. 29: UV-Diagramm von Yohimbin-Spiegel Probe und Vergleichslösung. Wellenlängenbereich: 205 nm - 295 nm

Aussehen:

rosafarbige Dragees, mit ca. 7 mm Durchmesser

Wirkstoffe pro Dragee:

Mesterolol 25 mg

Yohimbin-HCl 5 mg

(nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Yohimbin-HCl : siehe Yohimbin-Spiegel S. 103
Mesterolol wurde dünnschicht^{124,125)}- und
gaschromatographisch¹²⁶⁾ bereits untersucht.
Hochdruckflüssigchromatographische Verfahren
zur Bestimmung von Mesterolol sind bisher
nicht beschrieben worden.

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Das Filtrat der Suspension eines zerkleinerten Dragees wurde aufgetragen. Dann wurde mit einem basischen Laufmittel entwickelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht (Yohimbin) sowie durch Besprühen mit Dragendorffs Reagenz (Yohimbin) und 2,4 Dinitrophenylhydrazin (Mesterolol).

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Mesterolol ließ sich mit Hilfe einer reversed-phase Säule mit einem MeOH/H₂O-Gemisch als mobile Phase und Testosteronpropionat als interner Standard bestimmen. Als Detektion wurde wegen ungenügender UV-Absorption von Mesterolol (ein gesättigtes 3-Ketosteroid) ein Refraktometer benutzt.

2. 3. Photometrie

Die Bestimmung von Yohimbin erfolgte durch Vergleich der UV-Kurven einer Probe (Filtrat einer MeOH/CH₂Cl₂/Suspension) mit einer Eichlösung im Wellenlängenbereich von 250 nm - 300 nm.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

	Rf-Wert	UV	254 nm	350 nm	D 3	D 1
Reinsubstanzen						
Yohimbin-HCl	0.63		+	+	-	+
Mesterolol	0.74		-	-	+	+
Probe	0.63		+	+	-	+
	0.74		-	-	+	+

Außerdem war am Auftragepunkt ein rosa Fleck bei Tageslicht zu beobachten, bei dem es sich um den Drageefarbstoff handelte. Nach der Dragendorff Besprühung zeigten sowohl Yohimbin als auch Mesterolol einen orangefarbenen Fleck. Der Yohimbinfleck zeigte außerdem eine Fluoreszenzlösung (254 nm) sowie eine hellblaue Färbung (350 nm), der Mesterololfleck färbte sich nach Besprühen mit 2.4 DNPH zitronengelb. Beide Pluriviron-Inhaltsstoffe ließen sich eindeutig nachweisen und identifizieren.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Bestimmung von Mesterolol:

Mesterolol und der interne Standard konnten innerhalb von 10 Minuten basisliniengetreunt analysiert werden. Bereits nach ca. 3 Minuten

wurde ein großer Peak registriert, der alle auch in der mobilen Phase löslichen aber unpolareren Komponenten wiedergibt (u.A. Hilfsstoffe)

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Mesterolone	6.65 ± 0.05	12.3
Testosteronpropionat (int.St.)	8.57	16.1

Ermittelte Werte:

(n = 5)

$\bar{x}$ = 25.02 mg

s = 0.60

VK= 2.40

Wiederfindung: 99.2%

3. 3. Photometrie

Bestimmung von Yohimbin-HCl

Ermittelte Werte:

(n = 5)

$\bar{x}$ = 5.02 mg

s = 0.062

VK= 1.23

Wiederfindung: Einwaage ca. der Analyse
entsprechend. Bestimmung
mit den gleichen Parametern.
Yohimbin-HCl: 97.1%

Die quantitative Bestimmung beider Komponenten konnte mit Hilfe des Multikomponentenverfahrens nicht gelöst werden, da der UV-Kurve von Mesterolone ein charakteristisches Maximum fehlt. Gut bestimmbar ist Yohimbin, das bei 220 und 280 nm ein Maximum zeigt. Auch im Bereich von 200 - 245 nm wurden für Mesterolone reproduzierbare Werte nicht erhalten. Yohimbin war in diesem Bereich nicht bestimmbar. Ohne Abtrennung (DC oder HPLC) ist demnach eine gemeinsame photometrische Bestimmung von Mesterolone nicht möglich. Yohimbin allein läßt sich photometrisch neben Mesterolone bestimmen.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

Yohimbin-HCl

Mesterolone

Die Substanzen wurden in MeOH/CH₂Cl₂/Diethylamin = 8:1:1 aufgelöst, wobei die Mengen einem Dragee entsprachen.

Probe:

Ein im Mörser zerriebenes Dragee wurde in 5 ml MeOH/CH₂Cl₂/Diethylamin = 8:1:1 unter Ultraschall suspendiert. Anschließend wurde filtriert. (rosafarbige Lösung)

Bedingungen:

Stat. Phase:

Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase:

CH₂Cl₂/Essigester/Diethylamin 7:2:1

Laufzeit: 70 min
Laufhöhe: 15 cm
Detektion: UV 254 nm, 350 nm
Sprühreagenz: D 1, D 3
Auftragemenge: 10 µl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Konz.der Eichlösung:
26.4 mg Mesterolone
29.6 mg Testosteronprop.
in 25 ml mobiler Phase

Probenaufarbeitung:
Ein im Mörser zerriebenes Dragee wurde in
einem 25 ml Meßkolben mit mobiler Phase
und 5 ml Stammlösung int. Standards ($\approx$ 29.6mg
Testosteronprop.) versetzt. Dann wurde unter
Ultraschall suspendiert. Das klare Filtrat
wurde injiziert.

Bedingungen:
Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule
Mobile Phase: 80 proz. MeOH
Fluß: 0.5 ml/min
Papiervorschub: 0.3 cm/min
Detektion: Differential-Refraktometer
0.4 Attenuation
Injektionsvol.: 40 µl

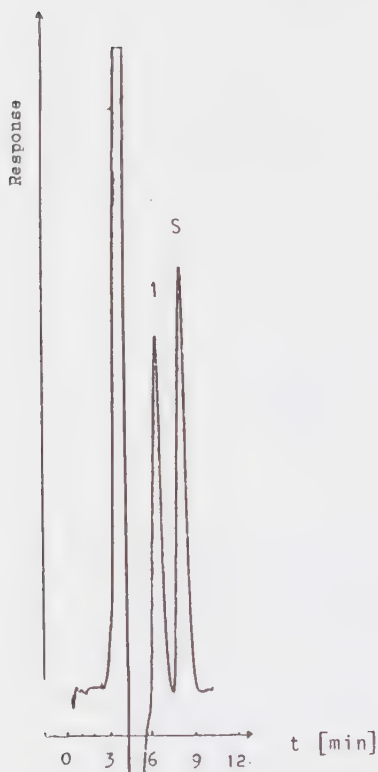
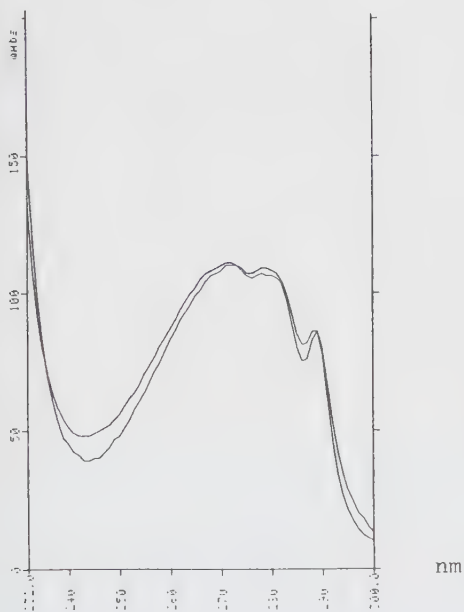


Abb. 30: Liquidchromatogramm eines Pluriviron Dragees zur Bestimmung von Mesterolone
1 = Mesterolone, S = Testosteronpropionat
(Bedingungen siehe S. 113)

4. 3. Photometrie

Probenaufarbeitung:

Ein im Mörser zerriebenes Dragee wurde in $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 9:1$ unter Ultraschall suspendiert, filtriert und auf 100 ml aufgefüllt.



31: UV-Diagramm von der Lösung eines Pluriviron-
Dragees und einer Yohimbin-Vergleichslösung
zur Bestimmung von Yohimbin
Raster: 1 nm
UV-Bereich: 232 nm - 300 nm

Tonol ^(R)

(Schering)

Aussehen:

Steckkapseln in gelb und braun, mit einer Länge von ca. 15 mm und einem Durchmesser von ca. 5 mm

Aufdruck:

C in einem Sechsring

Wirkstoffe pro Kapsel:

Mesterolone	7.5 mg
D- α -Tocopherolacetat	11 mg
Yohimbin-HCl	3 mg
Strychninnitrat	0.1 mg
Magnesiumnicotinat	10 mg

(nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Strychnin (siehe Ignatius-Extrakt S. 80), Yohimbin (siehe Yohimbin-Spiegel S. 103), Mesterolone (siehe Pluriviron S. 109)

Dünnschichtchromatographische Methoden von Tocopherolacetat ¹²⁷⁾ und Nicotinsäure ¹²⁸⁾ (nicht Magnesiumnicotinat) sind ebenso wie hochdruck-flüssigchromatographische Verfahren von Tocopherolacetat ^{129,130)} und Nicotinsäure bereits beschrieben worden. Die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Wirkstoffe in einem Gemisch, das aus einem Steroid, aus Alkaloiden und Vitaminen besteht, wie in Tonol, ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Das Filtrat der Suspension des Kapselinhaltes in einem Methanol/Dichlormethan/Wasser Gemisch oder in Wasser wurde auf Kieselgelplatten aufgetragen. Dann wurde mit 3 verschiedenen mobilen Phasen entwickelt. Ein basisches Laufmittel eignete sich zum Nachweis der Alkaloide sowie von Mesterolone. Die Identifizierung der Alkaloide erfolgte unter UV-Licht und mit Dragendorffs Reagenz; Mesterolone wurde nach dem Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin sichtbar. Ein neutrales Laufmittel diente zur Entwicklung des Tocopherolacetats, das durch Betrachtung im UV-Licht oder mit Cer-(IV)-sulfatlösung sichtbar wurde. Im sauren Laufmittel konnte Magnesiumnicotinat als freie Säure identifiziert werden.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Alle Bestimmungen wurden mit einer reversed-phase Säule ausgeführt. Magnesiumnicotinat, Strychninnitrat und Yohimbin-HCl konnten mit Methanol unter Zusatz eines sauren Puffers mit Chinidinsulfat als interner Standard bestimmt werden. Der Gehalt an Tocopherolacetat wurde mit 90 proz. Methanol als mobile Phase und Vitamin D₃ als interner Standard ermittelt. Bei beiden Bestimmungen wurde ein UV-Detektor verwendet. Mesterolone mußte wegen seiner geringen UV-Absorption mit einem Refraktometer detektiert werden. Als mobile Phase diente 80 proz. Methanol, als interner Standard Testosteronpropionat.

2. 3. Photometrie

Eine Bestimmung der 5 Inhaltsstoffe mit Hilfe des Multikomponentenverfahrens gelang nicht, weil die Konzentrationsunterschiede zu groß und der Kurvenverlauf einzelner Komponenten zu wenig charakteristisch waren.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

DC 1

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1	D 3
Reinsubstanzen					
Yohimbin-HCl	0.64	+	+	+	
Strychnin-NO ₃	0.58	+	-	+	
Mesterolone	0.71	-	-	+	+
Probe	0.64	+	+	+	
	0.58	+	-	+	
	0.71	-	-	+	+

Tocopherolacetat erscheint fast an der Laufmittelfront, Magnesiumnicotinat bleibt bei diesen Laufmittel als Salz am Auftragepunkt sitzen.

DC 2

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 4
Reinsubstanz				
Tocopherol-				
acetat	0.92	+	-	+
Probe	0.92	+	-	+

Bei Probe und Vergleichssubstanz traten nach dem Besprühen mit Cer-(IV)-sulfatlösung bei Tageslicht braune Flecken auf.

DC 3

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm
Reinsubstanz			
Mg-nicotinat	0.68	+	-
Probe	0.68	+	-

Hier gelang eine eindeutige Identifizierung der freien Nicotinsäure

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Magnesiumnicotinat, Strychninnitrat und Yohimbin-HCl

Eine völlige Basislinientrennung der Komponenten konnte nicht erreicht werden. Die Probe und die Eichlösung ergaben jedoch das gleiche Chromatogramm mit gleichen Integrationsmarken. Auch die Wiederfindung spricht für die Reproduzierbarkeit der angegebenen Methode.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Mg-nicotinat	4.60 $\pm$ 0.10	0,4
Strychnin-NO ₃	7.30 $\pm$ 0.06	1.3
Yohimbin-HCl	9.00 $\pm$ 0.10	1.8
Chinidin-SO ₄	9.86 $\pm$ 0.10	2,1

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Mg-nicotinat:

$\bar{x}$ = 8.43 mg

s = 0.22

VK= 2.61

Strychnin-NO₃:

$\bar{x}$ = 0.102 mg

s = 0.004

VK= 3.92

Yohimbin-HCl:

$\bar{x}$ = 3.04 mg

s = 0.023

VK= 0.76

Wiederfindung:

Mg-nicotinat: 100.1%

Strychninnitrat: 96.5%

Yohimbin-HCl: 99.5%

Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine Kapsel, sie sind aber aus 10 bzw. 5 Kapseln ermittelt.

Die Werte von Yohimbin und Strychnin stimmen gut mit den Firmenangaben überein. Nicht so bei Mg-nicotinat: In den Chromatogrammen ist schon aus den Peakhöhen in Eichlösungen und Probe (Verhältnis 11:9 cm) und bei nahezu identischer Peakhöhe der beiden int. Standardpeaks sowie der guten Peaksymmetrie zu ersehen, daß es sich um keinen Integrationsfehler handeln kann. Gegen die Annahme einer eher unvollständigen Lösung spricht die relativ gute Löslichkeit der freien Säure in Wasser (1.8 g/100 ml) und das Meßergebnis beim Analysieren einer Lösung mit geringerer Konzentrationen: Es wurden keine höheren Werte gefunden.

Versuche mit der Ionenpaarchromatographie führten wegen langer Analysenzeiten und starkem Tailing nicht zum Ziel. Auch die Anwendung einer polaren stationären Phase (Lichrosorb Si 60) führte nicht zu einer zufriedenstellenden Trennung.

3. 2. 2. Bestimmung von Tocopherolacetat

Hier gelang vollständige Basislinientrennung in einer Analysenzeit in knapp 10 min.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Vitamin D ₃ (int. Stand.)	4.85 $\pm$ 0.03	2.5
Tocopherol- acetat	7.90 $\pm$ 0.10	4.6

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Tocopherolacetat:

$\bar{x}$ = 11.64 mg / Kapsel

s = 0.06

VK= 0.52

Wiederfindung: 99.5%

3. 2. 3. Bestimmung von Mesterolon

Die Chromatogramme zeigten bereits nach ca. 2 - 3 Minuten einen sehr großen Peak. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Vielzahl verschiedener hydrophiler Substanzen, die sich neben den Wirkstoffen in 80 proz. MeOH gelöst hatten. Sie wurden bei der Integration nicht berücksichtigt.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Mesteroon	6.58 $\pm$ 0.04	1.4
Testosteron- propionat	8.62 $\pm$ 0.04	2.1
(int. Stand.)		
Ermittelte Werte:		
(n = 4)		

$\bar{x}$ = 7.54 mg / Kapsel

s = 0.07

VK= 0.93

Wiederfindung: 95.4%

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

Die Einwaagen entsprachen den Mengen, welche lt. Hersteller in einer Kapsel enthalten sind, gelöst in MeOH/CH₂Cl₂/H₂O 8:1:1.

Probenaufbereitung:

Je eine Kapsel wurde entleert und im Lösungsmittel

a) MeOH/CH₂Cl₂/H₂O 8:1:1 (für DC 1 und DC 2)

b) H₂O (für DC 3)

unter Ultraschall suspendiert und filtriert.

Bedingungen:(für 3 verschiedene DC bezeichnet mit 1, 2, 3)

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: 1, CH₂Cl₂/Essigester/Diethylamin
7:2:1

2, CHCl₃/EtOH 8:2

3, Isopropanol/H₂O/Eisessig
80:15:5

Laufzeit/

Laufhöhe: 1, 60 min / 14 cm
2, 40 min / 11 cm
3, 120 min / 13 cm

Detektion: 1, UV 254 nm 350 nm
Sprühreagenz: D 1, D 3
2, UV 254 nm
Sprühreagenz: D 4
3, UV 254 nm

Auftragemenge: 10 µl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Magnesiumnicotinat, Strychninnitrat und Yohimbin-HCl

Konz. der Eichlösung:

103.2 mg Magnesiumnicotinat

28.3 mg Yohimbin-HCl

1.01 mg Strychnin-NO₃

44.5 mg Chinidin-SO₄

in 50 ml mobiler Phase

Probenaufarbeitung:

10 Kapseln (diese Menge ist zur Detektion von Strychninnitrat - 0.1 mg / Kapsel - nötig) wurden entleert und mit mobiler Phase ausgespült; dann wurden 10 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 44,5 mg Chinidin-SO₄) zugegeben, unter Ultraschall suspendiert und auf 50 ml mit mobiler Phase aufgefüllt und filtriert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule

Mobile Phase: MeOH/KH₂PO₄-Puffer pH 2.6
0.005 M 41:56

Fluß: 0.5 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 254 nm/0.32 AUFS Magnesium-
nicotinat
0.005 AUFS Strychnin-
nitrat
0.08 AUFS Yohimbin-HCl
Chinidinsulfat

Injektionsvol: 8 μ l

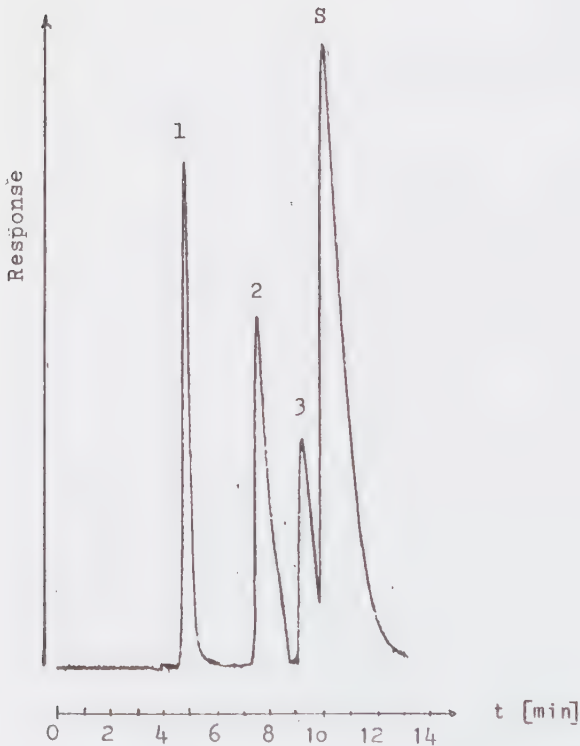


Abb. 32: Liquidchromatogramm von 10 Tonolkapseln gelöst in der mobilen Phase, zur Bestimmung der Alkaloide und Magnesiumnicotinat.

1 = Magnesiumnicotinat, 2 = Strychninnitrat, 3 = Yohimbin-HCl, Chinidinsulfat (int. St.)

(Bedingungen siehe S. 123)

4. 2. 2. Bestimmung von Tocopherolacetat

Konz. der Eichlösung:

20.68 mg Tocopherolacetat

6.30 mg Vitamin D₃

in 50 ml MeOH/CH₂Cl₂ 9:1

Probenaufarbeitung:

2 Kapseln wurden in 5 ml CH₂Cl₂ und 5 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 6.30 Vitamin D₃) unter Ultraschall suspendiert; nach dem Filtrieren wurde mit MeOH auf 50 ml aufgefüllt. (Aufgefüllt mit MeOH, da reine CH₂Cl₂ Probeneinspritzen störende RI-Effekte ergaben.)

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule

Mobile Phase: MeOH/H₂O 9:1

Fluß: 1.0 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 280 nm / 0.01 AUFS

Injektionsvol.: 15 µl



Abb. 33: Liquidchromatogramm von Tonol-Kapsel, gelöst in $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ zur Bestimmung von Tocopherolacetat
1 = Tocopherolacetat, S = Vitamin D_3
(Bedingungen siehe S. 125)

4. 2. 3. Bestimmung von Mesterolone

Konz. der Eichlösung:
39.0 mg Mesterolone
27.0 mg Testosteronpropionat
in 25 ml mobiler Phase

Die Einwaage entspricht der in 5 Kapseln zu erwartenden Menge.

Probenaufarbeitung:

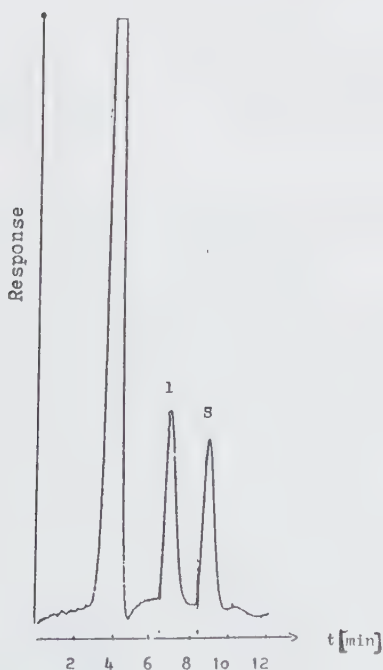
Der Inhalt von 5 Kapseln wurde in 10 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx 37,0$ mg Testosteronpropionat) und 10 ml mobile Phase unter Ultraschall suspendiert. Dann wurde auf 25 ml mit der mobilen Phase aufgefüllt und anschließend filtriert.

Bedingungen:

Siehe Bestimmung von Mesterolol in Pluriviron^(R)
S. 109

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Injektionsvol.: 10 μ l



bb. 34: Liquidchromatogramm von Tonol-Kapseln zur Bestimmung von Mesterolol 1 = Mesterolol, S = Testosteronpropionat (Bedingungen siehe S. 109)

Pasuma[®] Dragee

(Cascan)

Aussehen:

gelbgrüne Dragees, ca. 6 mm Durchmesser

Wirkstoffe pro Dragee:

Methyltestosteron	5 mg
α -Tocopherolacetat	3 mg
Yohimbin-HCl	3 mg
Strychniniumglycero- phosphat	0.35 mg
Coffein-Monohydrat	15 mg
Oxedrintartrat	25 mg
(nach Angaben des Herstellers)	

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Analyse von Tocopherolacetat (siehe Tonol S. 116), Yohimbin (siehe Yohimbin-Spiegel S. 103), Strychnin (siehe Ignatius-Extrakt S. 80) und Coffein (siehe Cola-Extrakt S. 69)

Oxedrin¹³¹⁻¹³²⁾ wurde ebenso wie Methyltestosteron¹³³⁻¹³⁴⁾ schon dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. Auch die hochdruckflüssigchromatographische Bestimmungen von Methyltestosteron^{134,135)} und von Oxedrin^{132, 136-138)} wurden in der Literatur erwähnt. Die Bestimmung dieser Wirkstoffe, kombiniert wie in vorliegenden Fertigarzneimittel, wurden noch nicht durchgeführt.

2. Eigene Untersuchung

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Das Filtrat der Suspension eines zerkleinerten Dragees in einem Gemisch von Methanol und Dichlormethan wurde auf eine Kieselgelplatte auf-

getragen. Es wurde mit einem basischen Laufmittel entwickelt. Alle 6 angegebenen Wirkstoffe konnten getrennt werden. Die Identifizierung gelang unter UV-Licht mit Liebermann-Burchards Reagenz (Methyltestosteron, Tocopherolacetat) und Dragendorffs Reagenz (Yohimbin, Strychnin, Coffein, Oxedrin). Ferner konnten die 4 basischen Substanzen nach einer Anreicherung über eine mit stark saurem Ionenaustauscher gefüllte Säule auf einer reversed-phase Platte mit einem schwach basischen Laufmittel aufgetrennt und identifiziert werden.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Alle Wirkstoffe ließen sich auf einer reversed-phase Säule unter isokratischen Bedingungen mit Hilfe eines internen Standards bestimmen. Als Probenlösung wurden die Filtrate eines wäßrigen und eines Dichlormethan-Extraktes verwendet. Die basischen Substanzen konnten sowohl durch Ionenpaarchromatographie mit einem Gemisch von Acetonitril und Pentansulfonat (Ausnahme: Strychnin) als auch mit einem Gemisch von Methanol und saurem Phosphatpuffer als mobile Phase bestimmt werden. Bei beiden Bestimmungen diente Codein-HCl als interner Standard. Coffein wurde auch im Dichlormethan-auszug neben Methyltestosteron mit Progesteron als interner Standard und einem Methanol/Wasser Gemisch als mobile Phase bestimmt. Tocopherolacetat wurde wegen seine lipophilen Charakters mit einem Laufmittel hoher Elutionskraft (95 proz. MeOH) und mit Vitamin D₃ als interner Standard analysiert.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

3. 1. 1. Kieselgelplatte

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 2	D 1
Reinsubstanzen					
Oxedrintar-					
trat	0.08	+	+	-	+
Strychnin-					
glyc.ph.	0.46	+	-	-	+
Yohimbin-					
HCl	0.60	+	+	-	+
Coffein	0.80	+	-	-	+
Methyltesto-					
steron	0.86	+	-	+	-
Tocopherol-					
acetat	0.95	+	-	+	-
Probe	0.08	+	-	-	+
	0.46	+	-	-	+
	0.60	+	+	-	+
	0.80	+	-	-	+
	0.86	+	-	+	-
	0.95	+	-	+	-

Methyltestosteron zeigte nach Besprühen mit Liebermann-Burchards Reagenz eine Orangefärbung, Tocopherolacetat lieferte einen violetten Fleck auf weißem Untergrund. Das gleiche ist bei der Probe zu beobachten. Darüberhinaus war bei der Probe am Auftragepunkt eine Schwarzfärbung zu erkennen, welche von Kohlenhydraten stammen dürfte (Drageehilfsstoff). Yohimbin zeigte bei 350 nm eine hellblaue Färbung, Besprühung mit Dragendorffs Reagenz führte zu einer Orangefärbung auf hellgelbem Untergrund.

3. 1. 2. Reversed-phase Platte

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm
Reinsubstanzen			
Strychninglycero-			
phosphat	0.11	+	-
Yohimbin-HCl	0.20	+	+
Oxedrintartrat	0.51	+	-
Coffein	0.66	+	-
Probe	0.11	+	-
(= Eluat 2 der	0.20	+	+
SCX-Säule, siehe	0.51	+	-
exp. Teil S.136)	0.68	+	-

Die 4 basischen Komponenten konnten alle eindeutig im Eluat 2 nachgewiesen werden. Methyltestosteron und Tocopherolacetat waren vollständig abgetrennt worden und nicht mehr nachweisbar.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Oxedrintartrat, Coffein, Strychninglycerophosphat und Yohimbin-HCl

Auf völlige Basislinientrennung wurde mit Rücksicht auf annehmbare Analysenzeiten und gute Peaksymmetrie verzichtet.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Oxedrintartrat	4.19 $\pm$ 0.03	0.3
Codein-HCl (int.St.)	5.25 $\pm$ 0.02	0.6
Coffein	6.77 $\pm$ 0.03	1.1
Strychninglycero-		
phosphat	9.30 $\pm$ 0.03	1.9
Yohimbin-HCl	11.28 $\pm$ 0.05	2.5

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Oxedrintartat:

$\bar{x}$ = 26.46 mg

s = 0.77

VK= 2.91

Coffein-Monohydrat:

$\bar{x}$ = 14.73 mg

s = 0.48

VK= 3.26

Strychninglycero-

phosphat:

$\bar{x}$ = 0.339 mg

s = 0.013

VK= 3.83

Yohimbin-HCl:

$\bar{x}$ = 2.73 mg

s = 0.038

VK= 1.39

Die für reines Coffein gefundenen Werte wurden auf das Monohydrat umgerechnet.

Wiederfindung:

Oxedrintartat: 102.8%

Coffein: 102.4%

Strychninglycerophosphat: 99.3%

Yohimbin-HCl: 102.6%

3. 2. 2. Bestimmung von Oxedrintartrat, Coffein und Yohimbin-HCl (Ionenpaarchromatographie!)

Da mit Ausnahme von Coffein alle im wäßrigen Filtrat befindlichen Wirkstoffe zur Salzbildung befähigt sind, bot sich die Verwendung der Ionenpaarchromatographie an. Mit dieser Methode war jedoch eine brauchbare Bestimmung von Strychnin nicht möglich. Selbst bei hoher Elutionskraft, großem Fluß und Verwendung einer kurzkettigen Sulfonsäure wurde Strychnin nur als niedriger Peak mit starkem Tailing erst nach ca. 16 Minuten eluiert. Die anderen 3 Wirkstoffe ließen sich

gut bestimmen, da sie in wesentlich größeren Mengen enthalten waren und schneller eluiert wurden.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Coffein	1.83 ± 0.01	0.3
Oxedrinartrat	4.88 ± 0.02	2.5
Codein-HCl (int. St.)	6.98 ± 0.03	4.0
Yohimbin-HCl	9.62 ± 0.03	5.9

Alle 3 Substanzen wurden basisliniengetrennt. Coffein wurde als erste Komponente eluiert, da es zur Ionenpaarbildung nicht befähigt ist.

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Coffein-Monohydrat:

$\bar{x} = 15.14 \text{ mg}$

s = 0.38

VK = 2.51

Oxedrinartrat:

$\bar{x} = 24.52 \text{ mg}$

s = 0.93

VK = 3.79

Yohimbin-HCl:

$\bar{x} = 2.65 \text{ mg}$

s = 0.042

VK = 1.58

Wiederfindung:

Coffein: 101.9%

Oxedrinartrat: 101.3%

Yohimbin-HCl: 100.0%

3. 2. 3. Bestimmung von Methyltestosteron und Coffein

Eine gleichzeitige Bestimmung von Tocopherol-acetat war nicht möglich. Mit einer mobilen Phase

sehr hoher Elutionskraft (95 proz. MeOH) wurde Tocopherolacetat zwar nach angemessener Zeit eluiert, jedoch war keine Abtrennung des Methyltestosterons vom ebenfalls in CH_2Cl_2 löslichen Coffein möglich. Eine Basislinientrennung konnte erreicht werden.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Coffein	2.92 ± 0.03	0.22
Methyltestosteron	5.13 ± 0.03	1.14
Progesteron (int. St.)	0.33 ± 0.03	1.63

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Coffein-Monohydrat:	Methyltestosteron:
$\bar{x} = 14.67 \text{ mg}$	$\bar{x} = 5.08 \text{ mg}$
$s = 0.59$	$s = 0.20$
VK= 1.91	VK= 3.94

Wiederfindung:

Coffein:	95.7%
Methyltestosteron:	96.1%

3. 2. 4. Bestimmung von Tocopherolacetat

Eine Basislinientrennung konnte innerhalb von 10 Minuten erreicht werden.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Vitamin D ₃ (int. St.)	5.76 ± 0.03	2.2
Tocopherolacetat	7.48 ± 0.02	3.2

Ermittelte Werte:

(n = 5)

$\bar{x}$ = 2.97 mg

s = 0.015

VK = 0.51

Wiederfindung: 99.1%

1. Experimenteller Teil

1.1. Dünnschichtchromatographie

1.1.1. Kieselgelplatte

Vergleichslösungen:

Die Einwaagen entsprachen den in 2 Dragees zu erwartenden Mengen. Jede Vergleichssubstanz wurde in 25 ml MeOH/CH₂Cl₂ 9:1 gelöst.

Probenaufbereitung:

2 im Mörser zerkleinerte Dragees wurden in ca. 20 ml MeOH/CH₂Cl₂ 9:1 unter Ultraschall suspendiert und anschließend filtriert und zu 25 ml aufgefüllt.

Bedingungen:

Stat. Phase:	Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH/NH ₃ (25%) 85:14:1
Laufhöhe:	1 h
Lauflänge:	14 cm
Detektion:	UV 254 nm und 350 nm Sprühreagenz: D 1, D 2
Auftragemenge:	20 µl

4. 1. 2. Reversed-phase Platte

Vergleichslösungen:

Identisch mit DC-Untersuchung auf polarer stat. Phase (S. 135)

Probenaufarbeitung:

Ein im Mörser zerkleinertes Dragee wurde in ca. 10 ml des Lösungsmittelgemisches MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ 9:1:1 (L 1) unter Ultraschall suspendiert und anschließend filtriert.

Abtrennungsvorgang:

Die SCX Kartusche wurde mit 1 ml L 1 konditioniert. Anschließend wurde in 1 ml Schritten das Filtrat der Probenlösung auf die Kartusche gegeben. Mit 1 ml L 1 und unter Anlegen eines Vakuums nachwaschen, um alle noch verbleibenden gelösten Reste abzusaugen (Eluat 1); dann wurde mit 3 x 1 ml 2 proz. Diethylaminlösung in MeOH/ CH_2Cl_2 9:1 direkt in einen 10 ml Meßkolben eluiert. Nach weiteren, unter Anlegen des Vakuums durchgesaugten 2 ml Diethylaminlösung (Eluat 2) wurde der Kolben mit L 1 bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wurde anschließend dünnschichtchromatographisch entwickelt.

Bedingungen:

Stat. Phase:	Nano-SIL C ₁₈ -50 UV ₂₅₄
Mobile Phase:	MeOH/Triethylamin-Formiat Puffer 0.01 M pH 8.0 81:19
Laufzeit:	30 min
Laufhöhe:	6.5 cm
Detektion:	UV 254 nm und 350 nm
Auftragmenge:	10 µl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Oxedrintartrat, Coffein, Strychninglycerophosphat und Yohimbin-HCl

Konz. der Eichlösung:

19.88 mg Oxedrintartrat

2.98 mg Yohimbin-HCl

15.1 mg Coffein

9.55 mg Codein-HCl

0.33 mg Strychninglycerophosphat
in 100 ml H₂O

Probenaufbereitung:

Ein im Mörtser zerkleinertes Dragee wurde unter Ultraschall bei gleichzeitigem Erwärmen in ca. 80 ml H₂O suspendiert (ca. 15 min). Nach dem Abkühlen und Zugabe von 10 ml der Stammlösung des int. Standards ($\cong$ 9.55 mg Codein-HCl) wurde mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Ein Teil der Suspension wurde vor der Injektion durch 2 Faltenfilter zu einer klaren Lösung filtriert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4)

Mobile Phase: MeOH/KH₂PO₄-Puffer 0.005 M
pH 2.6 43:57

Fluß: 0.4 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 254 nm / 0.005 AUFS

Injektionsvol.: 30 µl



Abb. 35: Liquidchromatogramm des wäßrigen Auszugs eines Pasuma-Dragees zur Bestimmung von:
1 = Oxedrintartrat, 2 = Coffein, 3 = Strychninglycerophosphat, 4 = Yohimbin-HCl mit S = Codein-HCl
(int. St.) (Bedingungen siehe S. 137)

2. 2. Bestimmung von Coffein, Oxedrinartrat und
Yohimbin-HCl (Ionenpaarchromatographie)

Bereitung der Eichlösung, sowie Probenaufar-
beitung sind mit obiger Bestimmung (MeOH/Phosphat-
puffer) identisch. (siehe S. 137)

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4)
Mobile Phase: Acetonitril/Pentansulfonat Natrium
0.01 M pH 3.5 7:3
Fluß: 1.6 ml/min
Papiervorschub: 0.5 cm/min
Detektion: UV 254 nm / 0.008 AUFS
(bis 3.6 min) 0.005 AUFS
Injektionsvol.: 80 µl

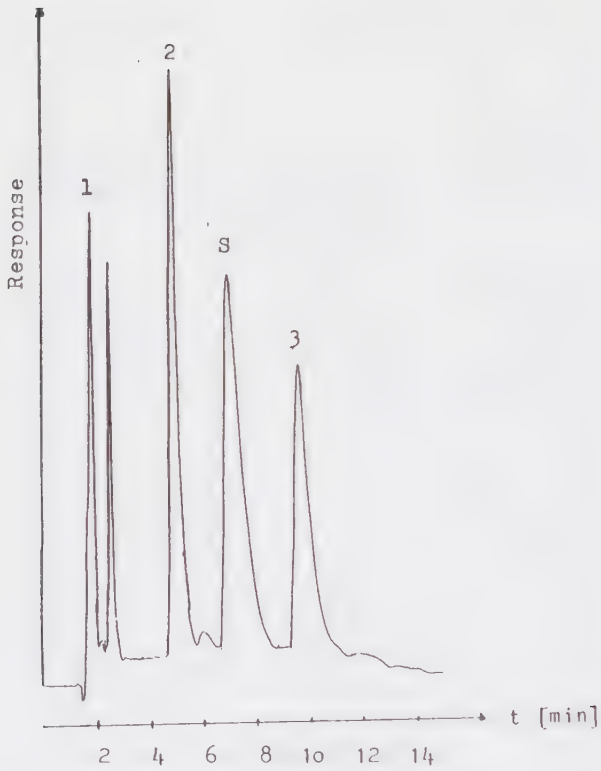


Abb. 36: Liquidchromatogramm des wässrigen Auszugs eines Pasuma-Dragees zur Bestimmung von:
1 = Coffein, 2 = Oxedrintartrat, 3 = Yohimbin-HCl
mit S = Codein-HCl (int. St.)
(Bedingungen siehe S. 139)

4. 2. 3. Bestimmung von Methyltestosteron und Coffein

Konz. der Eichlösung:

5.19 mg Progesteron

5.10 mg Methyltestosteron

14.61 mg Coffein

in 50 ml CH_2Cl_2

Probenaufbereitung:

Ein im Mörser zerkleinertes Dragee wurde nach der Zugabe von 5 ml int. Standardstammlösung und ca. 30 ml CH_2Cl_2 unter Ultraschall suspendiert. Anschließend wurde mit CH_2Cl_2 auf 50 ml aufgefüllt. Für die Injektion wurde ein Teil der Suspension filtriert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4)

Mobile Phase: MeOH/ H_2O 76:24

Fluß: 1.0 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 254 nm / 0.02 AUFS

Injektionsvol.: 10 μl

(Liquidchromatogramm siehe S. 143)

4. 2. 4. Bestimmung von Tocopherolacetat

Konz. der Eichlösung:

3.72 mg Tocopherolacetat

1.00 mg Vitamin D₃

in 50 ml CH₂Cl₂

Probenaufbereitung:

Ein im Mörser zerkleinertes Dragee wurde unter Ultraschall nach der Zugabe von 2 ml der Stammlösung des int. Standards und ca. 20 ml CH₂Cl₂ suspendiert und dann mit MeOH auf 50 ml aufgefüllt. Ein Teil dieser Suspension wurde anschließend filtriert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4)

Mobile Phase: MeOH/H₂O 95:5

Fluß: 0.5 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 280 nm / 0.005 AUFS

Injektionsvol.: 20 µl

(Liquidchromatogramm siehe S. 143)

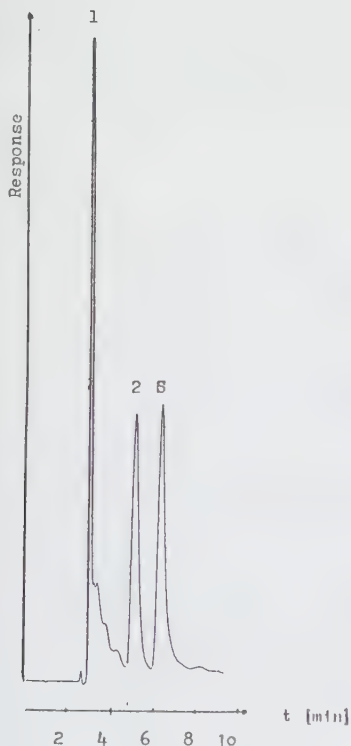


Abb. 37: Liquidchromatogramm des CH_2Cl_2 -Extrakts von einem Pasuma Dragee zur Bestimmung von Coffein und Methyltestosteron
1 = Coffein, 2 = Methyltestosteron. S = Progesteron (int. St.)
Bedingungen siehe S. 141

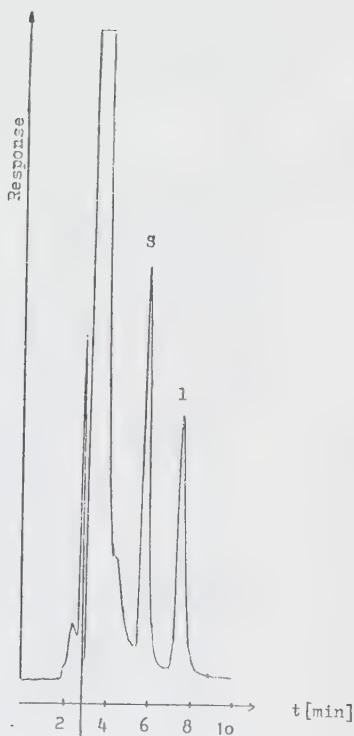


Abb. 38: Liquidchromatogramm des CH_2Cl_2 -Extraktes von einem Pasuma Dragee zur Bestimmung von Tocopherolacetat
1 = Tocopherolacetat, S = Vitamin D_3 (int.St.)
Bedingungen siehe S. 142

Pasuma[®] Ampulle

(Cascan)

Aussehen:

Braune Ampullen mit 1 ml einer farblosen Injektionslösung; Länge ca. 6 cm

Wirkstoffe pro Ampulle:

Testosteronpropionat	10	mg
α -Tocoperholacetat	20	mg
Yohimbin	6.46	mg
Strychnin	0.33	mg

ferner Glycerinphosphor-

säure 20.85 mg

(nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Yohimbin (siehe Yohimbin-Spiegel S. 103) Strychnin (siehe Ignatius-Extrakt S. 80), Tocopherolacetat (siehe Tonol S. 116) Dünnschicht¹³³⁾ - wie auch hochdruckflüssigchromatographische Verfahren¹³⁴⁻¹³⁷⁾ zur Analyse von Testosteronpropionat sind in der Literatur beschrieben. Die einzelnen Wirkstoffe wurden nebeneinander, wie in dieser Ampulle, noch nicht bestimmt.

2. Eigene Untersuchung

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Die mit Wasser verdünnte Injektionslösung wurde auf Kieselgelplatten aufgetragen. Zur Auftrennung der Alkaloide Strychnin und Yohimbin wurde ein basisches Laufmittel, zur Entwicklung der lipophileren Substanzen Tocopherolacetat und Testosteronpropionat ein Gemisch aus Hexan und Essig-

ester als Laufmittel verwendet. Die Identifizierung gelang unter UV-Licht und durch anschließendes Besprühen mit Dragendorffs Reagenz (Alkaloide) bzw. Liebermann-Burchards Reagenz (Testosteronpropionat, Tocopherolacetat)

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Alle Wirkstoffe ließen sich auf einer reversed-phase Säule mit Hilfe eines internen Standards bestimmen. Als mobile Phase wurde zur Bestimmung der Alkaloide ein Gemisch aus Methanol und saurem Phosphatpuffer unter isokratischen Bedingungen mit Codein-HCl als interner Standard verwendet. Als Probelösung diente eine mit Wasser verdünnte Injektionslösung. Tocopherolacetat und Testosteronpropionat wurden auch isokratisch mit einem Methanol/Wasser-Gemisch als mobile Phase und Vitamin D₃ als interner Standard bestimmt. Hier wurde das Filtrat des Ampulleninhaltes nach Verdünnung mit einem Methanol/Dichlormethan-Gemisch als Probenlösung verwendet.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

3. 1. 1. Basische Laufmittel (siehe exp. Teil S. 148)

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 2	D 1
Reinsubstanzen					
Strychnin	0.38	+	-	-	+
Yohimbin-HCl	0.60	+	+	-	+
Testosteronprop.	0.95	+	-	+	-
Tocopherolacetat	0.98	+	-	+	-
Probe	0.36	+	-	-	+
	0.58	+	+	-	+
	0.95	+	-	+	-
	0.98	+	-	+	-

Yohimbin zeigte ebenso wie die Probe im UV-Licht eine hellblaue Färbung. Obwohl eine Identifizierung möglich war (besprühen), erschien dieses Laufmittel für die Trennung von Tocopherolacetat und Testosteronpropionat wenig geeignet, da die Flecken beider Komponenten fast an der Laufmittelfront auftraten.

3. 1. 2. n-Hexan/Essigester als Laufmittel (siehe exp. Teil S. 148)

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 2
Reinsubstanzen				
Testosteronprop.	0.46	+	-	+
Tocopherolacetat	0.87	+	-	+
Probe	0.46	+	-	+
	0.87	+	-	+

Tocopherolacetat und Testosteronpropionat konnten mit diesem Verfahren in der Probe eindeutig nachgewiesen werden. Nach dem Besprühen mit Liebermann-Burchards Reagenz und anschließendem Erhitzen zeigte Testosteronpropionat eine blaugrüne Färbung, die sich beim Abkühlen in rosa verwandelte. Tocopherolacetat trat als gelbgrüner Fleck auf. Außerdem war am Auftragepunkt ein Fleck sichtbar, welcher unter UV-Licht bei 254 nm eine Fluoreszenzlösung und bei 350 nm eine hellblaue Fluoreszenz zeigt. Es handelt sich um die als Glycerophosphate vorliegenden Alkaloide Strychnin und Yohimbin.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Strychnin und Yohimbin

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Codein-HCl (int. St.)	4.03 ± 0.03	0.7
Strychnin	8.40 ± 0.14	2.5
Yohimbin	10.90 ± 0.20	3.5

Die 3 Komponenten konnten in 15 Minuten basisliniengetreunt werden.

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Strychnin:	Yohimbin:
$\bar{x} = 0.35 \text{ mg}$	$\bar{x} = 6.57 \text{ mg}$
$s = 0.0294$	$s = 0.0736$
VK= 0.832	VK= 1.12

Wiederfindung:

Strychnin:	112%
Yohimbin:	101.5%

3. 2. 2. Bestimmung von Testosteronpropionat und Tocopherolacetat

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Testosteronprop.	2.62 ± 0.03	1.5
Vitamin D ₃ (int.St.)	5.89 ± 0.03	2.1
Tocopherolacetat	9.50 ± 0.04	4.0

Die 3 Komponenten konnten in 12 Minuten basisliniengetreunt werden.

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Testosteronprop.: Tocopherolacetat:

$\bar{x}$ = 10.83 mg

$\bar{x}$ = 21.69 mg

s = 0.0044

s = 0.0826

VK= 0.041

VK= 0.381

Wiederfindung:

Testosteronpropionat: 100.1%

Tocopherolacetat: 100.3%

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

Die nach Art und Menge einer Ampullenfüllung entsprechenden Substanzen wurden zum einen in je 10 ml EtOH, zum anderen als Gemisch in 10 ml einer Glycerophosphat Stammlösung (208.5 mg D,L- α -Glycerophosphate Di-natriumsalz Hexahydrat in 100 ml H₂O) aufgelöst.

Probenaufarbeitung:

1 Ampulle wurde entleert, mit H₂O ausgespült und anschließend mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt.

Bedingungen: (für 2 verschiedene DC bezeichnet mit 1,2)

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: 1, CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (25%) 85:14:1

2, n-Hexan/Essigester 70:30

Laufzeit/-höhe: 1, 70 min / 13 cm

2, 90 min / 15 cm

Detektion: UV 254 nm und 350 nm

Sprühreagenz: D 1, D 2

Auftragemenge: 10 μ l

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Strychnin und Yohimbin

Konz. der Eichlösung:

Yohimbin: 6,409 mg

Codein-HCl: 9.55 mg

Strychnin: 0.344 mg

in 50 ml GDP-Lösung

GDP-Lösung: 417 mg D,L- α -Glycerophosphat
Dinatriumsalz in 1000 ml H₂O
(50 ml $\hat{=}$ Menge in einer Ampulle)

Probenaufbereitung:

Eine Ampulle wurde in einem Becherglas zerstoßen
Nach Zugabe von 10 ml der Stammlösung des int.
Standards ($\hat{=}$ 9.55 mg Codein-HCl) und ca. 10 ml
H₂O wurde von den Glasscherben abfiltriert. Das
Filtrat wurde anschließend mit H₂O auf 50 ml auf-
gefüllt.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule

Mobile Phase: MeOH/KH₂PO₄-Puffer 0.005 M pH 2.8
38:62

Fluß: 0.6 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: 254 nm / 0.01 AUFS

Injektionsvol.: 25 μ l



Abb. 39: Liquidchromatogramm der Mischung einer Ampullen-
füllung mit Wasser (1:9) zur Bestimmung von Yohim-
bin und Strychnin
1 = Strychnin, 2 = Yohimbin, S = Codein-HCl (int. St.)
(Bedingungen siehe S. 149)

4. 2. 2. Bestimmung von Testosteronpropionat und Tocopherolacetat

Konz. der Eichlösung:

Testosteronpropionat: 10.2 mg

Vitamin D₃: 6.3 mg

Tocopherolacetat: 20.68 mg

in 50 ml MeOH/CH₂Cl₂ 9:1

Probenaufbereitung:

Eine Ampulle wurde in einem Becherglas zerstossen. Nach Zugabe von 5 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 6.3 mg Vitamin D₃) und 10 ml MeOH/CH₂Cl₂ wurde von den Scherben abfiltriert. Das Filtrat wurde anschließend mit MeOH/CH₂Cl₂ auf 50 ml aufgefüllt.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule

Mobile Phase: MeOH/H₂O 9:1

Fluß: 0.8 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 254 nm / 0.08 AUFS Testosteronprop.

0.02 AUFS Vitamin D₃

0.005 AUFS Tocopherolacetat

Injektionsvol.: 15 µl

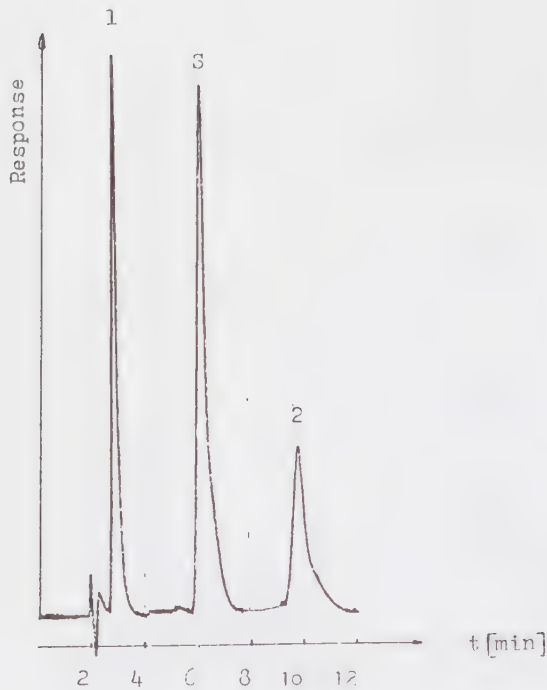


Abb. 40: Liquidchromatogramm eines MeOH/CH₂Cl₂-Extraktes einer Pasuma Ampullenfüllung zur Bestimmung von:
2 = Tocopherolacetat und 1 = Testosteronpropionat
3 = Vitamin D₃
(Bedingungen siehe S. 151)

b. Arzneimittel mit Reinsubstanzen und pflanzl. Extrakten

Testasa-e[®]

(Deutsche Chefaro Pharma GmbH)

Aussehen:

Steckkapseln (orange/violett) von ca. 15 mm Länge

Wirkstoffe pro Kapsel:

Extr. Colae e Semin.: 60 mg

Extr. Yohimbe: 50 mg

Extr. Muira Puama: 20 mg

α -Tocopherolacetat: 15 mg

(nach Angaben des Herstellers)

Dies ist die Zusammensetzung neuerer Chargen; in älteren Packungen, welche auch Ignatius-Extrakt enthielten, konnten Strychnin und Brucin nachgewiesen werden.

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Bisher bekannt gewordene Methoden zur Standardisierung der Extrakte siehe Yohimbe-Extrakt (siehe S.21) Cola-Extrakt (siehe S. 27) und Muira Puama-Extrakt (siehe S.43) . Bestimmungsmethoden von Tocopherolacetat (siehe Tonol S. 116). Die Bestimmung von Coffein und Yohimbin im Gemisch beider Extrakte sowie in Anwesenheit von Tocopherolacetat mit Hilfe der HPLC wurde noch nicht durchgeführt.

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Yohimbin und Coffein konnten im Kapselinhalt, also in den Yohimbe- bzw. Cola-Extrakten ebenso wie

Tocopherolacetat im UV-Licht und mit Dragendorffs Reagenz (Alkaloide) nachgewiesen werden. Eine quantitative Abtrennung des Tocopherolacetats von den Alkaloiden gelang mit einem sauren Ionenaustauscher. Die vollständige Abtrennung wurde dünn- und flüssigchromatographisch überprüft.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Zuerst wurde in einem Gemisch von Cola- und Yohimbe-Extrakt mit Codein-HCl als interner Standard die Menge an Coffein und Yohimbin nach Anreicherung über einen Ionenaustauscher bestimmt. Die Bestimmung wurde auf einer reversed-phase Säule mit einem Gemisch aus Methanol und basischem Puffer als mobile Phase mit Hilfe einer Gradientenelution und UV-Detektion bei 280 nm durchgeführt. Die Testasaprobe wurde in gleicher Weise nach Zusatz der int. Standards (Vitamin D₃ für Tocopherolacetat und Codein-HCl für die Alkaloide) aufgearbeitet. Im ersten Eluat (Eluat 1) der Ionenaustauschersäule waren Tocopherolacetat sowie Vitamin D₃ zu finden, während die Alkaloide nach der Elution mit Diethylaminlösung (Eluat 2) auftraten. Tocopherolacetat wurde mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser als mobile Phase isokratisch auf einer reversed-phase Säule ebenso wie die Alkaloide bestimmt. Auch im methanol. Filtrat der Kapsel konnten die Alkaloide bestimmt werden. Der Muira Puama-Extrakt wurde nicht analysiert, da in diesem Extrakt Wirkstoffe nicht nachweisbar waren. (siehe Muira Puama S. 43)

3. Ergebnisse

3. 1. Dünn- und flüssigchromatographie

3. 1. 1. Dünnschichtchromatographie mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Ammoniak (25%) (85:14:1) als mobile Phase auf einer Kieselgelplatte

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1
Vergleichssubstanzen				
Yohimbin-HCl	0.67	+	+	+
Coffein	0.75	+	-	+
Tocopherolacetat	0.92	+	-	-
Probe	0.00	+	+	-
(Filtrat einer	0.02	-	+	-
MeOH/H ₂ O/HCl	0.05	+	-	-
Suspension)	0.07	-	+	-
	0.09	-	+	-
	0.12	+	-	-
	0.14	-	+	-
	0.18	-	+	-
	0.19	-	+	-
	0.24	-	+	-
	0.39	-	+	-
	0.48	-	+	-
	0.53	+	+	+
	0.59	+	+	+
	0.63	+	+	+
	0.68	+	+	+
	0.75	+	-	+
	0.88	-	+	-
	0.92	+	-	-

Probe nach Trennung über Ionenaustauscher (CH₂Cl₂ Auszug)

Eluat 1	0.92	+	-	-
Eluat 2	0.53	+	+	+
	0.59	+	+	+
	0.63	+	+	+
	0.67	+	+	+
	0.75	+	-	+

Bei älteren Chargen waren noch zwei weitere Flecken zu beobachten, die eine Fluoreszenzlöschung bei 254 nm zeigten und eine Färbung mit Dragendorffs Reagenz ergaben:

0.41: Brucin

0.45: Strychnin (nachgewiesen mit Hilfe von Vergleichslösungen)

3. 1. 2. Mit einem Gemisch von Cyclohexan/Ether 8:2 als mobile Phase auf einer Kieselgelplatte

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1
Vergleichssubstanz				
Tocopherolacetat	0.62	+	-	-
Eluat 1	0.62	+	-	-

Yohimbin, Coffein und Tocopherolacetat konnten eindeutig nachgewiesen werden. Nach der Auftrennung über den Ionenaustauscher war Tocopherolacetat quantitativ im Eluat 1 zu finden, Coffein und Yohimbin mit seinen Nebenalkaloiden in Eluat 2. Nach weiterem Eluieren waren Alkaloide nicht mehr nachweisbar.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Coffein und Yohimbin in einem Gemisch des Cola- und Yohimbin-Extrakts, nach der Anreicherung über einen Ionenaustauscher.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Coffein	4.15 $\pm$ 0.03	1.0
Codein(int.St.)	13.00 $\pm$ 0.10	5.2
Yohimbin	17.50 $\pm$ 0.60	7.3

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Coffein:

$\bar{x}$ = 11.49 mg

s = 0.95

VK= 8.26

Einwaage an Cola-

Extrakt: 121,2 mg

Prozentgehalt: 9.48%

Yohimbin:

$\bar{x}$ = 1.24 mg

s = 0.07

VK= 5.64

Einwaage an Yohimbe-

Extrakt: 104.3 mg

Prozentgehalt: 1.19%

Wiederfindung:

Coffein: 103.5%

Yohimbin: 102.1%

3. 2. 2. Bestimmung von Coffein und Yohimbin in Testasa-Kapseln nach der Anreicherung über einen stark sauren Ionenaustauscher.

Ermittelte Werte: (2 Kapseln)

(n = 5)

Coffein:

$\bar{x}$ = 11.26 mg

s = 0.23

VK= 2.04

Gehalt pro Kapsel: 5.63mg

Yohimbin:

$\bar{x}$ = 1.07 mg

s = 0.06

VK= 5.6

Gehalt pro Kapsel: 0.54mg

Extraktmenge in einer Kapsel:

Cola-Extrakt:

Ermittelter Coffeingehalt: 9.48 mg / 100 mg Extrakt

Ermittelter Coffeingehalt in einer Kapsel: 5.63 mg

→ 59.4 mg Extr. Colae e Semin. / Kapsel

Yohimbe-Extrakt:

Ermittelter Yohimbingehalt: 1.19 mg / 100 mg Extrakt

Ermittelter Yohimbingehalt in einer Kapsel: 0.54 mg

→ 44.9 mg Extr. Yohimbehe / Kapsel

Die Alkaloide wurden im filtrierten methanol. Auszug einer Kapsel nach Zugabe des int. Standards unter den gleichen chromatographischen Bedingungen bestimmt. Das ebenfalls im Methanol lösliche Tocopherolacetat bleibt jedoch unter diesen Bedingungen auf der Säule und muß nach dem Chromatographieren von der Säule gewaschen werden. Zur Bestimmung des Tocopherolacetats ist eine Probenaufarbeitung unter Zusatz eines geeigneten int. Standards notwendig. Die Probenaufarbeitung mit Hilfe eines Ionenaustauschers besitzt folgende Vorteile:

Tocopherolacetat und die Alkaloide können nach einmaliger Probenaufarbeitung bestimmt werden und durch die Auftrennung in Eluat 1 und Eluat 2 wird die HPLC-Säule geschont.

3. 2. 3. Bestimmung von Tocopherolacetat

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Vitamin D ₃		
(int. Stand.)	6.90 $\pm$ 0.10	1.3
Tocopherolacetat	10.50 $\pm$ 0.10	2.5

Ermittelte Werte: (2 Kapseln)
(n = 5)

Tocopherolacetat:

$\bar{x}$ = 32.12 mg

s = 1.04

VK= 3.24

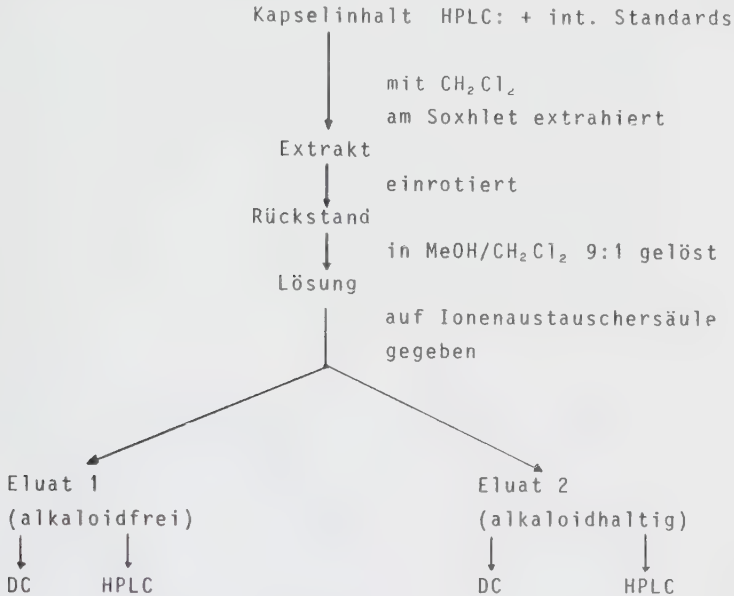
Gehalt pro Kapsel: 16.08 mg

Wiederfindung: 99.4%

Tocopherolacetat und der int. Standard befanden sich vollständig in Eluat 1 der Ionenaustauschersäule.

4. Experimenteller Teil

Übersicht der Ionenaustauscheraufarbeitung:



4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

Yohimbin-HCl (0.1%) in MeOH

Coffein (0.1%) in CH_2Cl_2

Tocopherolacetat (0.1%) in CH_2Cl_2

Probenaufarbeitung:

Filtrat:

Eine Kapsel wurde entleert und mit 5 ml einer 50 proz. MeOH-Lösung und einigen Tropfen 2 N HCl versetzt, 10 min ultrabeschallt und anschließend filtriert.

Ionenaustauscheranreicherung:

Der Inhalt einer Kapsel wurde 4 h am Soxhlet mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die Extraktionslösung wurde dann eingedampft und in 3 ml $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 9:1 (= L.1) aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde in Portionen zu 1 ml auf die bereits mit L.1 vorgespülten Ionenaustauschersäule gegeben. Nachdem mit 1 ml L.1 nachgewaschen worden war, wurde das Eluat abgepumpt ($\rightarrow$ Eluat 1). Anschließend wurden in 3 Portionen 3 ml einer 2 proz. Diethylaminlösung in L.1 auf die Säule gegeben und dann nach Zugabe von 2 weiteren ml der Diethylaminlösung zum Nachwaschen abgesaugt ($\rightarrow$ Eluat 2).

4. 1. 1. Bedingungen:

Stat. Phase:	Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Ammoniak}$ (25%) 85:14:1
Laufzeit:	50 min
Laufhöhe:	12 cm
Detektion:	UV 254 nm, 350 nm
	Sprühreagenz: D 1
Auftragemenge:	20 μl

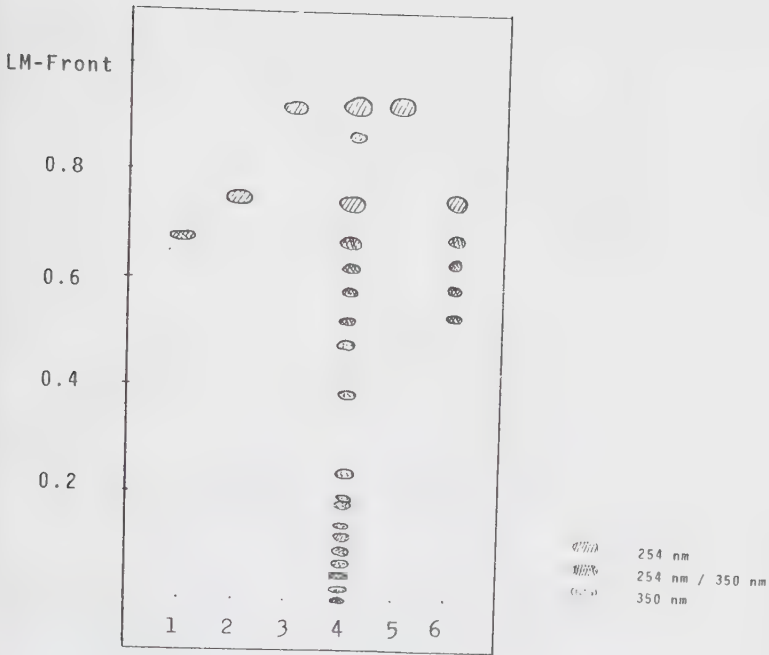


Abb. 41: DC vom wäßrig-methanol. Auszug einer Testasa Kapsel (= 4) sowie Eluat 1 (= 5) und Eluat 2 (= 6) eines CH_2Cl_2 Auszugs nach Auftrennung über einen sauren Ionenaustauscher.
 1 = Yohimbin-HCl, 2 = Coffein und 3 = Tocopherolacetat
 (Bedingungen siehe S. 160)

4. 1. 2. Bedingungen: DC-Prüfung auf Tocopherolacetat
 Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254
 Mobile Phase: Cyclohexan/Ether 8:2
 Laufzeit: 15 min
 Laufhöhe: 4.5 cm
 Detektion: UV 254 nm und 350 nm
 Sprühreagenz: D 1
 Auftragemenge: 10 μl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Coffein und Yohimbin in einem Gemisch aus Cola- und Yohimbe-Extrakt.

Konz. der Eichlösung:

Yohimbin: 1.814 mg

Coffein: 11.88 mg

Codein: 4.83 mg

in 10 ml L 1

Probenaufbereitung:

121.2 mg Extr. Colae e semin. und 104.3 mg Extr. Yohimbe wurden nach der Zugabe von 10 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 4.83 mg Codein) am Soxhlet 4 h mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der Probenaufbereitung für die DC (siehe S. 160). Das Ionenaustauschereluat wurde direkt in einem 10 ml Meßkolben aufgefangen. Nachdem dieser mit L 1 auf 10 ml aufgefüllt worden war, konnte die klare Lösung direkt injiziert werden.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4)

Mobile Phase: MeOH/Triethylamin-Ammoniumformiatpuffer 0.01 M pH 7.8

Gradient: Startbedingungen: 33.5%

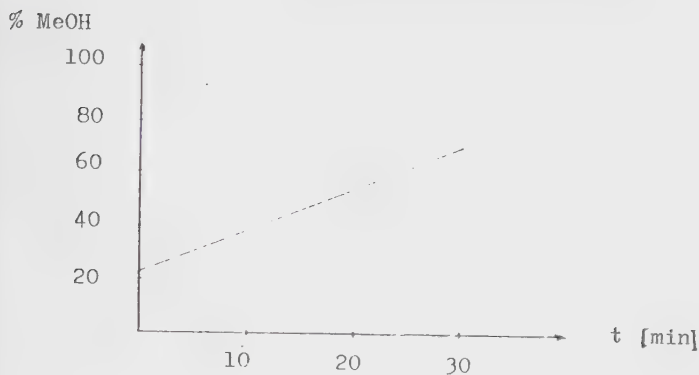


Abb. 42: Gradientenverlauf: Prozentanteil Methanol in Abhängigkeit von der Zeit.

Fluß: 1.5 ml/min
Papiervorschub: 0.5 cm/min
Detektion: UV 280 nm / 0.16 AUFS
ab 7. min: 0.01 AUFS
Injektionsvol.: 20 µl von Eluat 2

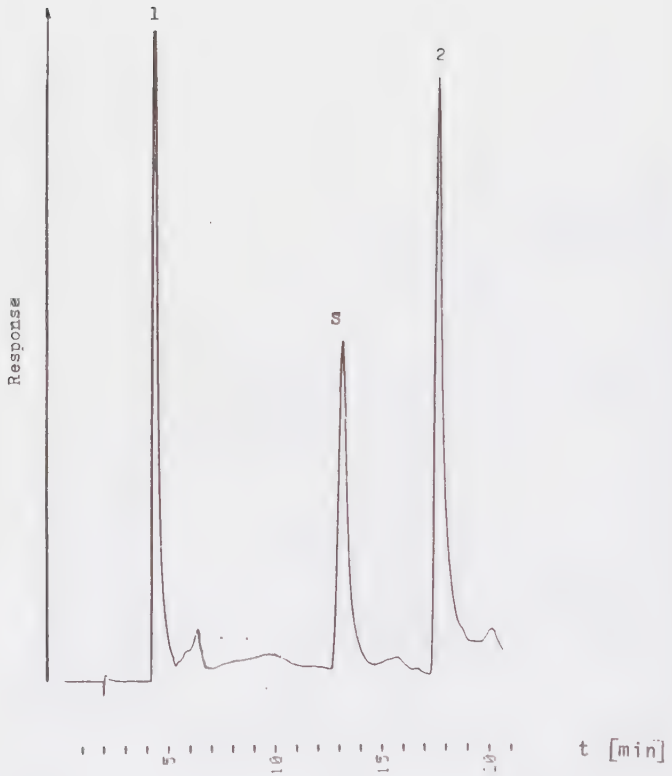


Abb. 43: Liquidchromatogramm der Eichlösung zur Bestimmung von Coffein und Yohimbin in einem Gemisch Extr. Colae und Extr. Yohimbe sowie in Testasa Kapseln
1 = Coffein, 2 = Yohimbin, S = Coffein (int. St.)
(Bedingungen siehe S. 162)

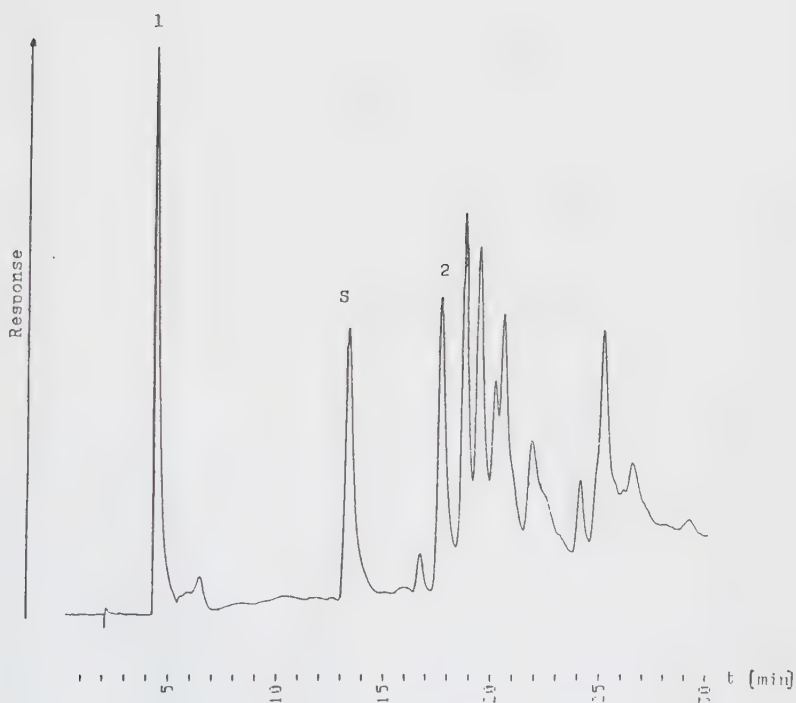


Abb. 44: Liquidchromatogramm eines CH_2Cl_2 Auszugs von einem Gemisch von Extr. Colae und Extr. Yohimbe nach Anreicherung der Alkaloide mit einem Ionenaustauscher.

1 = Coffein, 2 = Yohimbin, S = Codein (int. St.)
(Bedingungen siehe S. 163)

4. 2. 2. Bestimmung von Coffein und Yohimbin in Testasa[®]

Konz. der Eichlösung:

wie 4.2.1.

Probenaufbereitung:

Der Inhalt von 2 Kapseln wurde nach Zugabe von 10 ml der Stammlösung des int. Standards (≈ 4.83 mg Codein) für die Alkaloidbestimmung und Vitamin D₃ (6.0 mg Vitamin D₃) für die Bestimmung von Tocopherolacetat (siehe S. 167) am Soxhlet wie in 4.2.1. beschrieben, extrahiert und weiter aufgearbeitet.

Eluate des Ionenaustauschers:

Eluat 2 enthielt Alkaloide (Coffein, Yohimbin) sowie Codein als int. Standard

Eluat 1 enthielt Tocopherolacetat sowie Vitamin D₃ als int. Standard. Bestimmung siehe 4.2.3.

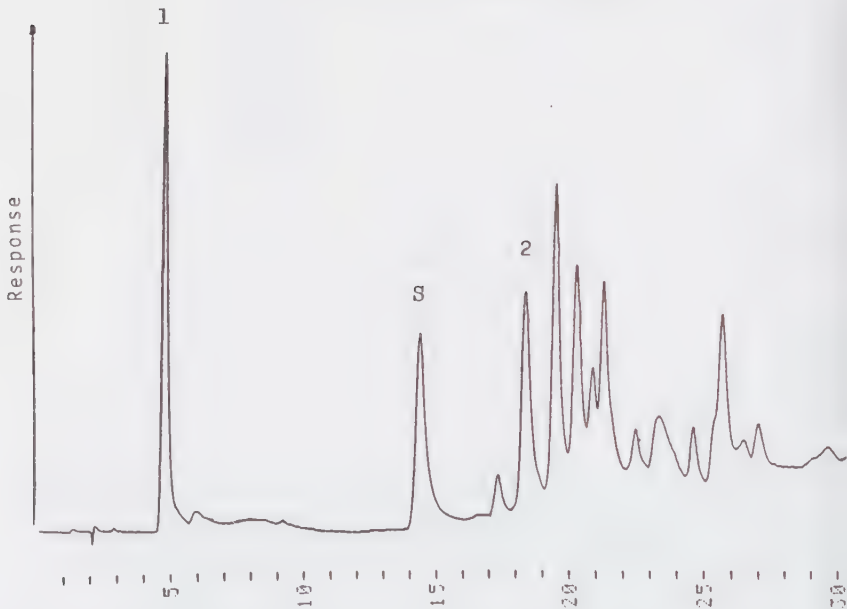


Abb. 45: Liquidchromatogramm eines CH₂Cl₂Auszugs aus 2 Kapseln Testasa, sonst wie Abb. 4

4. 2. 3. Bestimmung von Tocopherolacetat

Konz. der Eichlösung:

Vitamin D₃ (int. St.): 6.0 mg

Tocopherolacetat: 29.4 mg

in 10 ml L 1

Probenaufbereitung:

wie 3.2.1.

Probenlösung: Eluat 1

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4) + Vorsäule

Mobile Phase: MeOH/H₂O 93:7

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 280 nm / 0.04 AUFS

Injektionsvol.: 5 µl, 10 µl

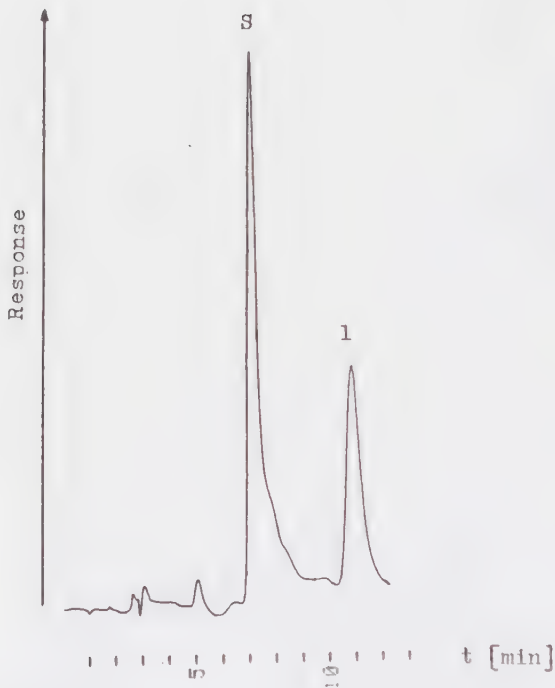


Abb. 46: Liquidchromatogramm der Probe (Eluat 1) zur Bestimmung von Tocopherolacetat (in Testasa[®] Kapseln)
1 = Tocopherolacetat, S = Vitamin D₃ (int. St.)
(Bedingungen siehe S. 167)

Puamin ^(R)

(Pharmakos GmbH & Co KG)

Aussehen:

weiße Dragees mit ca. 10 mm Durchmesser

Wirkstoffe pro Dragee:

Nicametalcitrat	100 mg
Extr. Muira Puama spir. sicc. (10:1)	10 mg
Extr. Yohimbe spir. sicc. (10:1)	30 mg
Tocopherolacetat	2 mg

(nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Yohimbe-Extrakt (siehe S. 21), Muira Puama-Extrakt (siehe S. 116) und Tocopherolacetat (siehe Tonol S. 109) Der Nachweis von Nicametalcitrat ist in der Literatur mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ¹⁴³⁾, die Bestimmung durch Spektroskopie ¹⁴⁴⁾ oder Titration ¹⁴⁵⁾ beschrieben.

2. Eigene Untersuchung

2. 1. Dünnschichtchromatographie

In einem basischen Laufmittel konnten nach Entwicklung auf einer Kieselgelplatte Yohimbin (Wirkstoff des Yohimbe-Extrakts), Tocopherolacetat und Nicametalcitrat im Filtrat einer Suspension des Dragees in 50 proz. EtOH unter UV-Licht bei 254 nm und 350 nm nachgewiesen werden.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Der Gehalt an Yohimbe-Extrakt und Nicametalcitrat ließ sich in einem Gemisch von Acetonitril und basischen Puffer als mobile Phase mit Valium als interner Standard auf einer reversed-phase Säule mit

Gradientenelution und UV-Detektion bei 254 nm bestimmen. Mit Hilfe der bereits durchgeführten Bestimmung des Yohimbegehalts dieses Yohimbe-Extraktes (siehe S. 28) konnte der Gehalt an Yohimbin im Dragee errechnet werden.

Tocopherolacetat konnte im Dichlormethanauszug des Dragees isokratisch mit 90 proz. MeOH als mobile Phase auf einer reversed-phase Säule und UV-Detektion bei 280 nm bestimmt werden.

Der Muira Puama-Extrakt wurde nicht bestimmt, da er keine Wirk- oder Leitsubstanzen enthält.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm
Vergleichssubstanzen			
Yohimbin-HCl	0.67	+	+
Nicametacitrat	0.63	+	-
Tocopherolacetat	0.95	+	-
Probe	0.01	+	+
(Filtrat einer	0.02	+	+
50 proz. EtOH	0.06	+	-
Suspension)	0.07	-	+
	0.09	-	+
	0.11	+	-
	0.14	-	+
	0.18	-	+
	0.20	-	+
	0.23	-	+
	0.37	-	+
	0.45	-	+
	0.52	+	+
	0.55	+	+
	0.61	+	-
	0.67	+	+
	0.85	-	+
	0.95	+	-

Yohimbin, Nicametatcitrat und Tocopherolacetat konnten an Hand der Vergleichssubstanzen eindeutig in der Probe nachgewiesen werden. Der Fleck von Nicametatcitrat war aufgrund der großen Menge im Dragee sehr stark.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Nicametatcitrat und Yohimbe-Extrakt

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Nicametatcitrat	8.34 ± 0.06	2.6
Yohimbin	12.46 ± 0.12	4.4
Valium [®] (int. St.)	17.98 ± 0.15	6.8

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Nicametatcitrat:	Yohimbe-Extrakt:
$\bar{x} = 110.6 \text{ mg}$	$\bar{x} = 31.70 \text{ mg}$
s = 1.62	s = 1.25
VK = 1.46	VK = 3.94

Gehalt des Extraktes an Yohimbin:

1.17 mg / 100 mg Extrakt (siehe S. 29)

→ 0.37 mg Yohimbin/Dragee

Wiederfindung:

Nicametatcitrat:	95.1%
Yohimbe-Extrakt:	102.3%

3. 2. 2. Bestimmung von Tocopherolacetat

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Vitamin D ₃ (int. Stand.)	4.29 ± 0.04	1.15
Tocopherolacetat	6.85 ± 0.05	2.42

Ermittelte Werte:

(n = 4)

$\bar{x}$ = 1.86 mg

s = 0.017

VK = 0.91

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

0.1 proz. Lösung von Nicametacitrat in 50 proz. EtOH

0.05 proz. Lösung von Yohimbin-HCl in 50 proz. EtOH

0.02 proz. Lösung von Tocopherolacetat in EtOH

Probenaufarbeitung:

Ein Dragee wurde im Mörser zerrieben und mit 6 ml 50 proz. EtOH versetzt und unter Ultraschall suspendiert. Vom Filtrat der Suspension wurde 20 µl auf die Platte aufgetragen.

Bedingungen:

Stat. Phase:

Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase:

CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (25%)

85:15:1

Laufzeit:

50 min

Laufhöhe:

11.5 cm

Detektion:

UV 254 nm und 350 nm

Auftragemenge:

20 µl

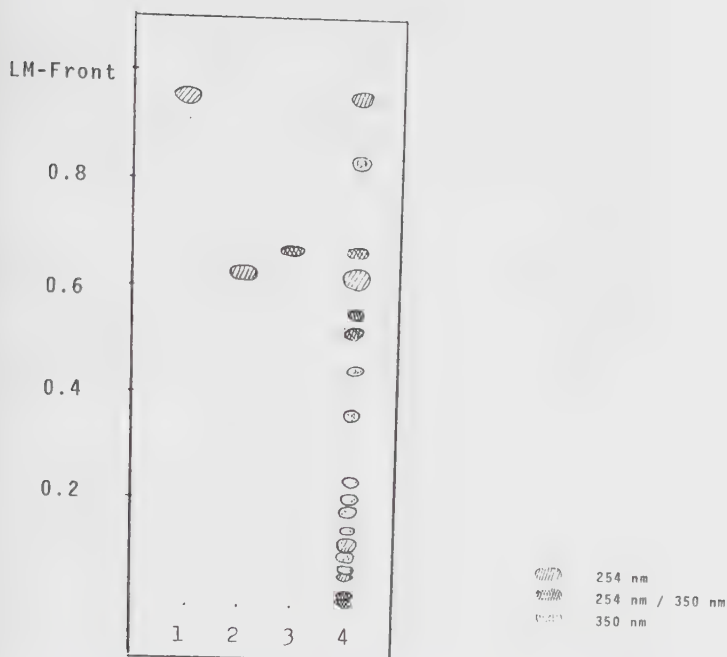


Abb. 47: DC des wäßrig-ethanol. Filtrats eines Puamin Dragees und von Lösungen der Vergleichssubstanzen

1 = Tocopherolacetat, 2 = Nicametacitrat, 3 = Yohimbin-HCl, 4 = Probe
(Bedingungen siehe S. 172)

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Nicametacitrat und Yohimbe-Extrakt

Konz. der Eichlösung:

Yohimbe-Extrakt: 30.3 mg

Nicametacitrat: 103.6 mg

Valium® 1.88 mg

in 10 ml 60 proz. MeOH

Probenaufbereitung:

1 Dragee, im Mörser zerrieben, wurde mit 1 ml der Stammlösung des int. Standards (≈ 1.88 mg Valium) versetzt und dann im Meßkolben mit 60 proz. MeOH auf 10 ml aufgefüllt. Es wurde 30 min unter Ultraschall suspendiert und anschließend ein Teil der Suspension filtriert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4) + Vorsäule
Mobile Phase: Acetonitril/Triethylamin-
Ammoniumformiatpuffer 0.01 M pH 7.9
Gradient: Startbedingungen: 40% Acetonitril

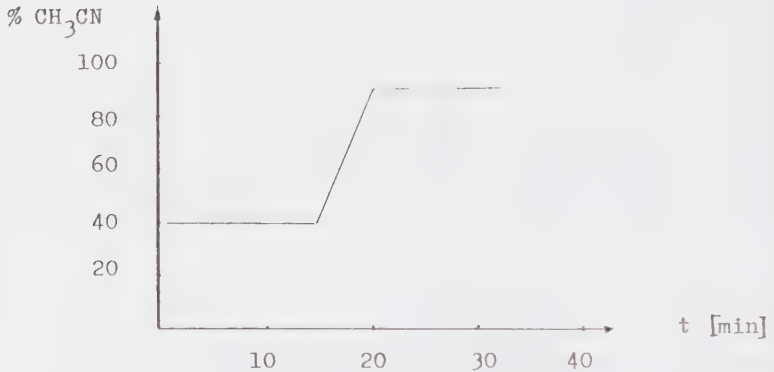


Abb. 48: Gradientenverlauf: Prozentanteil Acetonitril in Abhängigkeit von der Zeit.

Fluß: 0.9 ml/min
Papiervorschub: 0.25 cm/min
Detektion: UV 254 nm / 0.005 AUFS
Attenuation: 6
Injektionsvol.: 10 µl

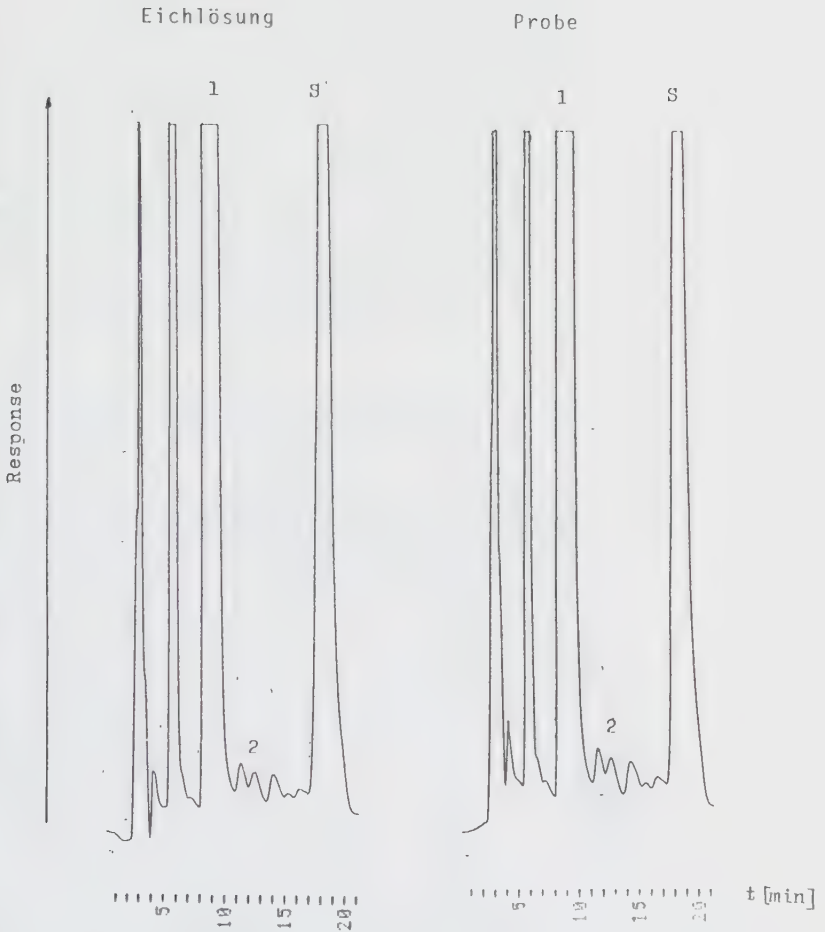


Abb. 49: Liquidchromatogramm der Eichlösung sowie der Puamin Probe mit Valium als int. Standard.
1 = Nicametacitrat, 2 = Yohimbin und S = Valium
(Bedingungen siehe S. 174)

4. 2. 2. Bestimmung Tocopherolacetat

Konz. der Eichlösung:

Tocopherolacetat: 2.54 mg

Vitamin D₃: 1.30 mg

in 10 ml CH₂Cl₂

Probenaufbereitung:

1 Dragee, im Mörser zerrieben, wurde mit 1 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 1.30 mg Vitamin D₃) versetzt und dann mit CH₂Cl₂ auf 10 ml aufgefüllt und unter Ultraschall suspendiert. Ein Teil der Suspension wurde filtriert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule

Mobile Phase: MeOH/H₂O 9:1

Fluß: 1.0 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min

Detektion: UV 280 nm / 0.005 AUFS

Injektionsvol.: 10 µl

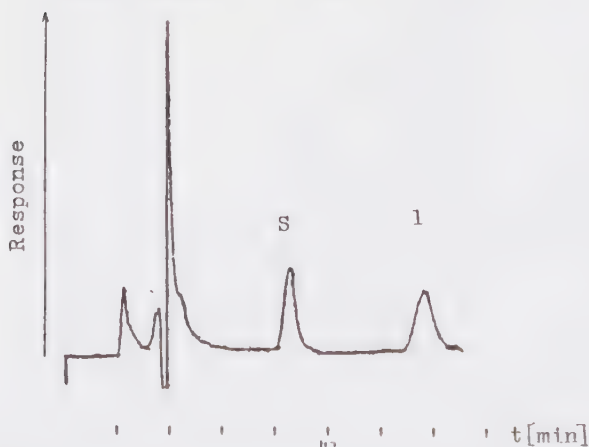


Abb. 50: Liquidchromatogramm von der Probelösung eines Puamin-Dragees zur Bestimmung von Tocopherolacetat mit Vitamin D₃ als int. Standard.
1 = Tocopherolacetat, S = Vitamin D₃
(Bedingungen siehe oben)

Tonaton[®]

(Fa. Luitpold)

Aussehen:

hellgelbe Dragees mit ca. 10 mm Durchmesser

Wirkstoffe pro Dragee:

Extr. Cort. Yohimbe	12.5 mg
---------------------	---------

Extr. Sem. Ignatii	12.5 mg
--------------------	---------

Atropinmethonitrat	0.3 mg
--------------------	--------

Ephedrinhydrochlorid	3.3 mg
----------------------	--------

(nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher analytische Verfahren

Chromatographische Methoden zur Bestimmung der beiden Extrakte siehe Extr. Yohimbe (siehe S. 21) und Extr. Ignatii (siehe S. 80)

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der beiden Reinsubstanzen Atropinmethonitrat ^{146,147}) und Ephedrin-HCl ^{131,146}) sind ebenso wie hochdruck-flüssigchromatographische Verfahren zur Bestimmung von Atropinmethonitrat ^{149,150}) und Ephedrin-HCl ¹⁵¹⁻¹⁵³) beschrieben worden. Der Nachweis und die Bestimmung der Wirksubstanzen der Extrakte sowie der Reinsubstanzen nebeneinander, wie sie in diesem Fertigarzneimittel vorkommen, wurden noch nicht durchgeführt.

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Mit dc-Methoden konnten die beiden Reinsubstanzen sowie die beschriebenen Wirkstoffe (Yohimbin, Strychnin, Brucin) der beiden Extrakte nachgewiesen werden. Ephedrin sowie Yohimbin, Strychnin und Brucin ließen sich sowohl nach Anreicherung mit einem stark sauren Ionenaustauscher, als auch in einem methanol. Extrakt

und zwar auf einer Kieselgelplatte mit einem Gemisch aus Chloroform, Essigester und Diethylamin als mobile Phase und Dragendorffs Reagenz nachweisen. Atropinmethonitrat war im wäßrigen Auszug des Dragees auf einer Kieselgelplatte mit einem Gemisch aus Methanol und wäßriger Ammoniumnitratlösung als mobile Phase nachweisbar.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Die Bestimmung von Ephedrin-HCl, Yohimbe-Extrakt und Ignatius-Extrakt wurde mit einem internen Standard auf einer reversed-phase Säule isokratisch mit einem Methanol/ KH_2PO_4 -Puffer Gemisch und UV-Detektion bei 254 nm durchgeführt. Die Eichlösung - aus Ephedrin-HCl, dem internen Standard Lidocain-HCl, sowie entsprechender Mengen der beiden Extrakte bestehend - wurde ebenso wie die Probe (ein pulverisiertes Dragee) vor der Injektion aus einer alkalischen methanol-wäßrigen Lösung mehrmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Extrakte mit den basischen Komponenten wurden vereinigt und dann injiziert. Unter diesen Bedingungen lieferten die Alkaloide Strychnin und Brucin als Repräsentanten des Ignatius-Extraktes einen Peak, der bei kurzer Analysenzeit einen eindeutigen Rückschluß auf die in der Probe vorhandene Menge des Ignatius-Extrakts zuläßt. Der Gehalt der beiden Alkaloide wurde bereits unter anderen chromatographischen Bedingungen bestimmt und konnte so aus der ermittelten Extraktmenge errechnet werden. (siehe S. 90)

Eine quantitative Bestimmung von Atropinmethonitrat gelang nicht. Dieses quartäre Ammoniumsalz zeigt im Gegensatz zu den anderen Inhaltsstoffen nur eine geringe UV-Absorption und ist darüber hinaus nur in sehr niedriger Konzentration im Dragee enthalten.

Der Methylatropiniumsalz-Peak wurde im Liquidchromatogramm stets von den Peaks der pflanzl. Begleitstoffe, welche im gleichen UV-Bereich absorbieren, überdeckt. Ebenso wenig gelang in der wäßrigen Phase nach Entfernen der sauren und basischen Stoffe durch Ausschütteln ein Nachweis. Eine Extraktion des Atropinmethonitrats mit einem org. Lösungsmittel (Dichlormethan, Essigester) nach Bildung eines Ionenpaars mit Sulfonaten bzw. eines Zwitterions durch Reaktion mit Phthalsäureanhydrid scheiterte an unvollständiger Veresterung oder zu geringer Löslichkeit in der org. Phase. Auch die HPLC Bestimmung der Tropasäure, einem Hydrolyseprodukt des Atropinmethonitrats, mißlang wegen zu geringer Konzentration bzw. zu starker Absorption der Begleitstoffe. Schließlich war auch für eine Ausfällung des Atropinmethonitrats mit Reinecke-Salz die Konzentration zu gering; es entstand weder ein Niederschlag noch eine Trübung.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

3. 1. 1. mit einem Chloroform/Essigester/Diethylamin Gemisch als Laufmittel

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1
Reinsubstanzen				
Atropinmetho-				
nitrat	0.00	+	-	+
Ephedrin-HCl	0.22	+	-	+
Brucinsulfat	0.46	+	-	+
Strychninnitrat	0.54	+	-	+
Yohimbin-HCl	0.64	+	+	+
Proben: (SCX)	0.00	+	+	+
Eluat 1*	0.05	+	+	-
	0.80	-	+	-
	0.92	-	+	-

	Rf-Wert	UV	254 nm	350 nm	D 1
Eluat 2*	0.46	+	-	+	
	0.54	+	-	+	
	0.64	+	+	+	
	0.73	+	+	+	
	0.85	+	+	+	
Eluat 3*	0.22	+	-	+	
Probe:	0.00	+	+	+	
(methanol.	0.05	+	+	+	
Filtrat)	0.22	+	-	+	
	0.28	-	+	-	
	0.33	-	+	-	
	0.46	+	-	+	
	0.54	+	-	+	
	0.64	+	+	+	
	0.73	+	+	+	
	0.80	-	+	-	
	0.85	+	+	+	
	0.92	-	+	-	

*Eluate der Probenaufarbeitung mit stark saurem Ionenaustauscher

Eluat 1: Substanzen ohne Affinität zum Ionenaustauscher

Eluat 2: Substanzen, welche mit Triethylaminlösungen eluiert werden

Eluat 3: Substanzen, welche mit Diethylaminlösung eluiert werden

genauere Angaben: siehe exp. Teil S.183

3. 1. 2. mit einem Methanol/Ammoniumnitratlösung Gemisch als Laufmittel

	Rf-Wert	UV	254 nm	350 nm	D 1
Reinsubstanzen					
Atropinmethanonitrat					
0.1%	0.38	+	-	+	
Atropinmethanonitrat					
0.03%	0.38	-	-	+	

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1
Probe (Rück-	0.25	+	+	-
stand von	0.29	+	-	+
Auszug in	0.38	-	-	+
H ₂ O)	0.64	+	+	-
	0.71	-	+	-
	0.75	-	+	-
	0.93	-	+	-

Mit Hilfe zweier dünnschichtchromatographischer Systeme konnten die beiden Reinsubstanzen sowie die Alkaloide der Extrakte nachgewiesen werden. Das quartäre Salz Atropinmethonitrat blieb im basischen Laufmittel am Auftragepunkt sitzen, konnte jedoch mit einem Gemisch aus Methanol und wäßriger Ammoniumnitratlösung chromatographiert werden. Die geringen Mengen an Atropinmethonitrat waren jedoch erst nach Besprühen mit Dragendorffs-Reagenz nachweisbar. Im UV-Licht bei 254 nm war keine Fluoreszenzlöschung zu beobachten. Eine Atropinmethonitrat -Vergleichslösung verhielt sich ebenso. Bei der Anreicherung der Alkaloide mit einem Ionenaustauscher gelang die Abtrennung der sek. Base Ephedrin von den übrigen Alkaloiden (tert. Basen), die sich mit Triethylamin zuerst von der Ionenaustauschersäule eluieren ließen (Eluat 2), während die Elution von Ephedrin dann mit Diethylamin möglich war.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Die Gehaltsbestimmung dauerte 15 Minuten.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Ephedrin	3.63 $\pm$ 0.13	1.8
Lidocain (int.St.)	6.35 $\pm$ 0.20	3.9
Strychnin/Brucin	8.58 $\pm$ 0.10	5.6
Yohimbin	11.60 $\pm$ 0.15	7.9

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Ephedrin-HCl:

Ignatius-Extrakt: (= Strychnin/
Brucin Peak)

$\bar{x}$ = 3.65 mg

$\bar{x}$ = 11.25 mg

s = 0.204

s = 0.249

VK= 5.58

VK= 2.19

Yohimbe-Extrakt:

(= Yohimbin Peak)

$\bar{x}$ = 12.90 mg

s = 0.397

VK= 3.07

Wiederfindung:

Ephedrin-HCl: 105.0%

Ignatius-Extrakt: 96.6%

Yohimbe-Extrakt: 100.8%

Gehalt an Yohimbin, Strychnin und Brucin pro Dragee:

Die HPLC Analysen von Yohimbe- und Ignatius-Extrakt wurden bereits unter anderen Bedingungen durchgeführt. Mit diesen wesentlichen längerdauernden Analysenmethoden gelang allerdings eine völlige Abtrennung des Yohimbins von seinen Nebenalkaloiden sowie eine Trennung von Strychnin und Brucin. (Yohimbe-Extrakt siehe S. 37, Ignatius-Extrakt siehe S. 87)

Yohimbe-Extrakt:

Ermittelte Menge an Yohimbin: 3.41 mg/100 mg Extrakt
in einem Dragee: 0.440 mg Yohimbin

Ignatius-Extrakt:

Ermittelte Menge an Strychnin: 3.61 mg/100 mg Extrakt
Brucin : 3.57 mg/100 mg Extrakt
in einem Dragee: 0.406 mg Strychnin
0.402 mg Brucin

Der Gehalt der Alkaloide im Dragee wurde aus den ermittelten Extraktmengen errechnet.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

4. 1. 1. mit einem Gemisch aus CHCl_3 /Essigester/Diethylamin als Laufmittel

Vergleichslösungen:

0.1 proz. Lösungen von Yohimbin-HCl, Strychnin-nitrat, Brucinsulfat, Ephedrin-HCl, Atropin-methonitrat in Methanol

Probenaufbereitung:

1 Dragee wurde im Mörser zerrieben und mit 6 ml Methanol und einigen Tropfen 2 N HCl versetzt und unter Ultraschall suspendiert. Das Filtrat der Suspension wurde einrotiert und der Rückstand in 2 ml Methanol aufgenommen. 20 μl dieser Lösung wurden auf die Platte aufgetragen. Nach dem gleichen Verfahren wurde ein zweites Dragee aufgearbeitet und die methanol. Lösung auf einen stark sauren Ionenaustauscher gegeben.

Die Säule wurde mit 2 ml MeOH vorbehandelt. Anschließend wurden die 2 ml der methanol. Probenlösung in 2 Portionen auf die Säule gebracht. Dann wurde mit 1 ml MeOH nachgewaschen und mit Vakuum abgesaugt ($\rightarrow$ Eluat 1). Dann wurden 2 ml einer methanol. Triethylaminlösung (2%) auf die Säule gegeben und mit Vakuum abgesaugt ($\rightarrow$ Eluat 2)

Anschließend wurde mit 2 ml einer methanol.
Diethylaminlösung (2%) mit Vakuum eluiert
(→Eluat 3).

Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: CHCl_3 /Essigester/Diethylamin
70:15:15

Laufzeit: 60 min

Laufhöhe: 13 cm

Detektion: UV 254 nm, 350 nm

Sprühreagenz: D 1

Auftragemenge: Proben: 20 μl

Vergleichslösungen: 10 μl



Abb. 51: DC des methanol. Filtrats und der Ionenaustauscher-
eluates eines Tonaton Dragees und von Lösungen der
Vergleichssubstanzen. 1 = Atropinmethonitrat, 2 =
Ephedrin-HCl, 3 = Brucinsulfat, 4 = Strychninnitrat
5 = Yohimbin-HCl, 6 = Eluat 1, 7 = Eluat 2, 8 = Eluat 3
9 = methanol. Lösung der Probe (Bedingungen siehe

4. 1. 2. mit einem Gemisch aus Methanol und Ammonium-nitratlösung als Laufmittel

Vergleichslösungen:

0.1 proz. wäßrige Atropinmethonitratlösung

0.03 proz. wäßrige Atropinmethonitratlösung

Probenaufarbeitung:

2 Dragees wurden in einem Mörser zerkleinert und mit etwa 20 ml H_2O versetzt, dann wurde die Suspension unter Rückfluß 30 min erhitzt, filtriert und das Filtrat eingedampft. Anschließend wurden 2 ml EtOH zugesetzt und unter Ultraschall suspendiert. Nach einer weiteren Filtration

Filtrat = Probe(EtOH) wurde der verbleibende Rückstand in H_2O gelöst = Probe(H_2O)

Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: MeOH/ 0.2 N NH_4NO_3 3:2

Laufzeit: 45 min

Laufhöhe: 13 cm

Detektion: UV 254 nm, 350 nm

Sprühreagenz: D 1

Auftragemenge: 20 μ l



Abb. 52: DC der wäßrigen Extrakte zweier Tonaton Dragees und zum Vergleich Atropinmethonitrat in 2 Konzentrationen 1 = Atropinmethonitrat (0.1%), 2 = Atropinmethonitrat (0.03%), 3 = Probe (EtOH), 4 = Probe (H₂O) (Bedingungen siehe S.185)

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Bestimmung von Ephedrin-HCl und von Extr. Ignatii sowie Extr. Yohimbe

Konz. der Eichlösung:

12.50 mg Ignatii-Extrakt und 12.40 mg Yohimbe-Extrakt wurden vereinigt und nach Zugabe von 1 ml der Ephedrin-HCl Stammlösung /168.4 mg / 50 ml 50 proz. MeOH), 2 ml der Stammlösung des int. Standards Lidocain-HCl (55.1 mg / 50 ml 50 proz. MeOH) und einigen Tropfen 2 N HCl mit

50 proz. MeOH auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend wurde mit Hilfe von Ultraschall suspendiert und dann filtriert. Das Filtrat wurde in einem 50 ml Scheidetrichter mit 6 N Ammoniak alkalisiert und anschließend dreimal mit je 6 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden einrotiert, der Rückstand wurde in EtOH gelöst und auf 10 ml aufgefüllt.

Konz. der Eichlösung:

Ephedrin-HCl:	3.368 mg
Lidocain-HCl:	2.204 mg
Extr. Ignatii:	12.50 mg
Extr. Yohimbe:	12.40 mg

in 10 ml EtOH

Probenaufarbeitung:

1 Dragee, im Mörser zerrieben, wurde mit 2 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 2.20 mg Lidocain-HCl) und einigen Tropfen 2 N HCl versetzt. Dann wurde mit 50 proz. MeOH auf 10 ml aufgefüllt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Eichlösung.

Bedingungen:

Säule:	Lichrosorb 100 RP-8 (125-4) + Perisorb C
Mobile Phase:	$\text{MeOH/KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer 0.01 M pH 2.8 30:70
Fluß:	0.5 ml/min
Papiervorschub:	0.25 cm/min
Detektion:	UV 254 nm / 0.01 AUFS
	Attenuation: 4
Injektionsvol.:	10 μ l

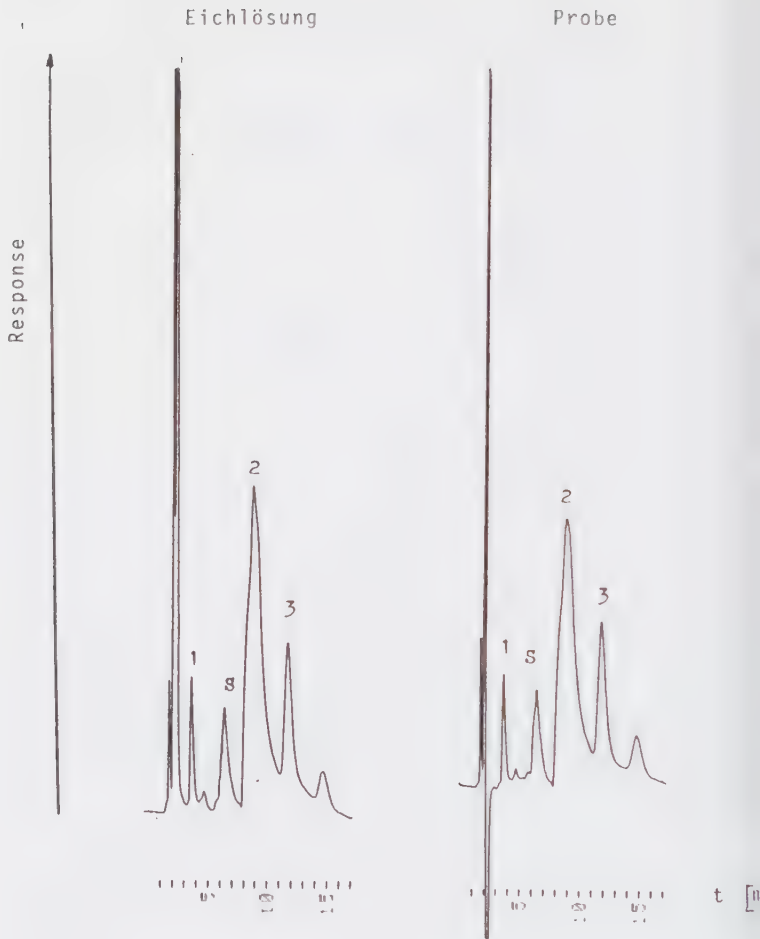


Abb. 53: Liquidchromatogramm der Eichlösung
und der Probe (ein Tonaton Dragee, Aufarbeitung
siehe S. 185-186)
1 = Ephedrin-HCl, 2 = Strychnin/Brucin, 3 =
Yohimbin und S = Lidocain-HCl als int. Standard.
(Bedingungen siehe S. 187)

c. Arzneimittel mit Reinsubstanzen und Organextrakten

Testifortan [®]

(Promonta)

Aussehen:

Farblose Ampullen mit 2 ml Injektionslösung

Wirkstoffe pro Ampulle:

Auszug aus 4.65 g Testes (Keimdrüsen; Frischorgan)

Papaverin-HCl: 1.0 mg

Yohimbin-HCl: 1.15 mg

Propyl-4-Hydroxybenzoat 0.2 mg

Benzoessäure 2.0 mg

(nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren.

Extrakte aus tierischem Material (siehe S. 91) , Yohimbin (siehe Yohimbin-Spiegel S. 103)

Dünnschichtchromatographische Nachweise von Papaverin¹⁵⁴⁾, PHB-Estern und Benzoessäure¹⁵⁵⁾ sind in der Literatur erwähnt. Die Bestimmungen von Konservierungsstoffen wie Benzoessäure, der PHB-Ester^{156,157)} und von Papaverin¹⁵³⁾ mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie sind bereits beschrieben.

Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung der vier in der Ampulle enthaltenen Reinsubstanzen nebeneinander in einem Analysengang wurden noch nicht durchgeführt.

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Dünnschichtchromatographie

In einer ethanolisch-wässrigen Verdünnung der Probe konnten alle 4 angegebenen Reinsubstanzen auf einer Kieselgelplatte mit basischen Laufmitteln (siehe exp. Teil S. 196) nachgewiesen werden. Nur der PHB-Ester Fleck wurde vom Yohimbin Fleck völlig überdeckt. Erst

nach der Trennung der basischen Substanzen (Papaverin, Yohimbin) von den sauren Substanzen (Benzoesäure, PHB-Ester) durch Ausschütteln konnte in der organischen Phase der PHB-Ester abgetrennt vom Yohimbin nachgewiesen werden. Die beste Auftrennung der Inhaltsstoffe wurde mit einem Gemisch aus Dichlormethan und Ethanol als mobile Phase auf einer Kieselgelplatte erreicht. Die Identifizierung erfolgte durch UV-Licht (254 nm, 350 nm) sowie durch Besprühen mit Dragendorffs Reagenz.

Für das Vorhandensein eines Testes Auszugs sprach ein Peptidchromatogramm-Muster, das nach Entwicklung der methanol. - wäßrigen Verdünnung der Probe in einem Gemisch aus Butanol, Wasser und Eisessig als Laufmittel auf einer Kieselgelplatte und anschließender Detektion mit Ninhydrin zu beobachten war. Ein qualitativer Unterschied im Peptidmuster zu einem aus Vergleichsgründen aufgetragenen Testes sicc. Extraktes war nicht festzustellen. Androgene Sexualhormone konnten selbst nach Abtrennung der übrigen Inhaltsstoffe und Verwendung verschiedener Detektionsverfahren nicht nachgewiesen werden.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Die neben dem Extrakt angegebenen 4 Inhaltsstoffe in der mit mobiler Phase verdünnten Probe auf einer reversed-phase Säule mit der Ionenpaarchromatographie (Gemisch aus Acetonitril und Pentansulfonat) unter isokratischen Bedingungen bestimmt werden. Als interner Standard eignete sich Codein-HCl. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht bei 280 nm. Unterschiedliche Probenaufbereitungen führten zum gleichen Ergebnis (siehe exp. Teil S. 200).

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

3. 1. 1. mit basischem Laufmittel

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1	D 10	D
Reinsubstanzen						
Benzoessäure	0.08	+	-	-		
Yohimbin-HCl	0.64	+	+	+		
PHB-Propylester	0.65	+	-	-		
Testosteron	0.72	+	-	-	+	+
Methyltestosteron	0.78	+	-	-	+	+
Papaverin-HCl	0.84	+	+	+		
Probe	0.08	+	-	-	-	-
(60 proz. EtOH)	0.64	+	+	+	-	-
	0.85	+	+	+	-	-
Probe	0.64	+	+	+		
(CH ₂ Cl ₂ A ₁)	0.85	+	+	+		
Probe	0.08	+	-	-		
(CH ₂ Cl ₂ B)*	0.64	+	-	-		
Probe (H ₂ O)*	-	-	-	-	-	-
Probe						
(CH ₂ Cl ₂ A)*	-	-	-	-	-	-

* siehe experimenteller Teil: Ausschüttelvorgang

Zur Prüfung auf Sexualhormone im Testes-Extrakt wurden Testosteron und Methyltestosteron zusammen mit den 4 angegebenen Inhaltsstoffen und verschiedenen aus dem Ausschüttelgang gewonnenen Phasen der Probe chromatographiert. Die beiden Hormone konnten unter den angegebenen Bedingungen (siehe exp. Teil S. 197) gut von den übrigen Inhaltsstoffen getrennt werden. Bei der orangefarbenen Flecken im Tageslicht, während sie nach Besprühung mit Isonicotinsäurehydrazid (Reagenz zum

Nachweis von 3 - Δ^4 Ketosteroiden) als gelbe Flecken unter UV-Licht bei 350 nm zu beobachten waren. Weder in der Probe (H_2O) (bedingt durch eventuelle Lösungsvermittler) noch in der Probe (CH_2Cl_2A), welche nach dem Ausschütteln mögliche Hormone enthalten sollte, konnte eine Färbung mit einem der beiden angegebenen Sprühreagenzien festgestellt werden. (Siehe Nachweisgrenzen der Hormone S. 94).

Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der mit 60 proz. EtOH verdünnten Probe konnten nur 3 Komponenten identifiziert werden. Der PHB-Ester, welcher nur eine Fluoreszenzlöschung bei 254 nm aufweist, wurde vom Yohimbin (gleicher Rf-Wert) überdeckt. Erst nach saurem und alkalischem Ausschütteln, bei dem eine Trennung des PHB-Esters von Yohimbin erreicht wurde, war in der Säurefraktion (Probe CH_2Cl_2B) ein Fleck erkennbar der zwar den gleichen Rf-Wert wie Yohimbin besaß, aber nur noch eine Fluoreszenzlöschung bei 254 nm zeigte und mit Dragendorffs Reagenz nicht anfärbbar war. Dieser Fleck konnte somit eindeutig als der PHB-Ester identifiziert werden.

3. 1. 2. Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Ethanol

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1
Reinsubstanzen				
Yohimbin-HCl	0.11	+	+	+
Benzoessäure	0.42	+	-	-
Papaverin-HCl	0.53	+	+	+
PHB-Ester	0.65	+	-	-
Probe	0.12	+	+	+
(60 proz. EtOH)	0.43	+	-	-
	0.55	+	+	+
	0.66	+	-	-

Mit diesem Laufmittel war ein qualitativer Nachweis in ca. 30 Minuten möglich.

3. 1. 3. Laufmittelgemisch aus Butanol, Wasser und Eisessig

	Rf-Wert	D 22
Vergleichsextrakt		
Testes sicc. plv. 0.06		orange
(Kanolt) 0.17		rotbraun
in 50 proz. MeOH 0.20		rot (kräftig)
	0.24	rosa
	0.34	rosa
	0.44	rotbraun
	0.46	rot
Probe 0.06		orange
(in 50 proz. 0.17		rotbraun
MeOH) 0.20		rot
	0.24	rosa
	0.34	rosa
	0.44	rotbraun
	0.46	rot

Die Chromatogramme der Probe und der Vergleichsextrakte waren sowohl hinsichtlich der Fleckenzahl wie der Fleckenfärbung und der Farbintensitäten identisch. Außerdem war nach der Besprühung noch eine größere Zahl anderer Flecken mit sehr geringer Intensität zu beobachten.

Das Peptidmuster des Chromatogramms ließ auf die Anwesenheit eines tierischen Extraktes schließen. Ob es sich dabei um einen Testes-Extrakt handelte, war nicht mit Sicherheit festzustellen, da andere tierische Extrakte (Cerebrum-, Placenta-, Hypophysenvorderlappen-Extrakt) das gleiche Peptidmuster zeigten.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Es wurde eine nahezu vollständige Basislinientrennung bei einer Analysenzeit von 12 Minuten erreicht.

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Codein-HCl (int. St.)	4.20 $\pm$ 0.04	0.9
Benzoessäure	5.45 $\pm$ 0.03	1.5
Yohimbin-HCl	7.23 $\pm$ 0.05	2.3
Papaverin-HCl	9.38 $\pm$ 0.05	3.3
PHB-Ester	10.85 $\pm$ 0.05	3.9

Ermittelte Werte:

(n = 5)

Benzoessäure:

$\bar{x}$ = 1.98 mg

s = 0.022

VK= 1.11

Yohimbin-HCl:

$\bar{x}$ = 1.12 mg

s = 0.019

VK= 1.70

Papaverin:

$\bar{x}$ = 0.94 mg

s = 0.023

VK= 2.45

PHB-Propylester:

$\bar{x}$ = 0.18 mg

s = 0.01

VK= 5.55

Wiederfindung:

Benzoessäure: 99.63%

Yohimbin-HCl: 101.35%

Papaverin-HCl: 101.69%

PHB-Propylester: 99.88%

Alle 3 Methoden zur Probenaufbereitung führten zum gleichen Ergebnis. Am einfachsten und schnellsten durchführbar war Methode (c), die kein Filtrieren oder Nachspülen erforderte (siehe exp. Teil S. 200) Diese Aufarbeitung besitzt jedoch den Nachteil, daß man nicht die absolute Menge der Wirkstoffe pro Ampulle, sondern nur deren Konzentration bestimmt. Mögliche Abweichungen im Injektionsvolumen können so bei einer Qualitätskontrolle nicht festgestellt werden.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

4. 1. 1. mit einem basischem Laufmittel

Vergleichslösungen:

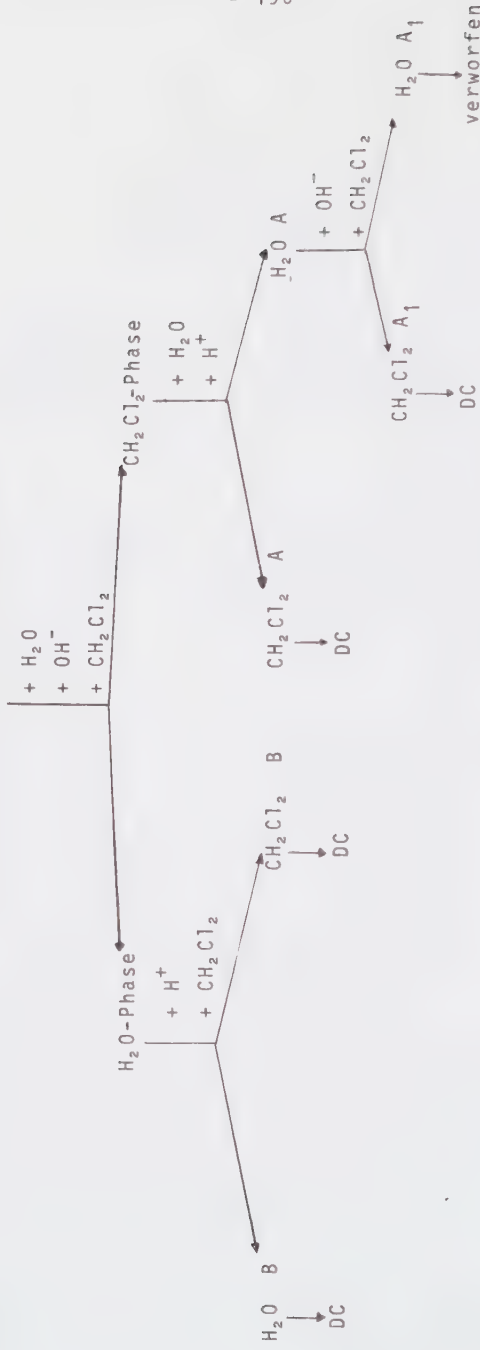
Die Reinsubstanzen, nach Art und Menge dem Inhalt einer Ampullenlösung entsprechend, und je 1.0 mg Testosteron und Methyltestosteron wurden in 5 ml 60 proz. EtOH gelöst.

Probenaufarbeitung:

Der Inhalt einer Ampulle wurde mit 60 proz. EtOH auf 5 ml aufgefüllt und dann nach folgendem Verfahren extrahiert:

Ausschüttelvorgang:

Ampullenlösung in 60 proz. EtOH



Die Lösung H₂O könnte bei Anwesenheit von Lösungsvermittlern Hormone enthalten

CH₂Cl₂ B enthält schwach und stark saure Komponenten

CH₂Cl₂ A könnte in CH₂Cl₂ lösliche Hormone enthalten

CH₂Cl₂ A₁ enthält basische Komponenten

Angesäuert wurde jeweils mit 2 N Salzsäure, alkalisiert mit 25 proz. Ammoniak, Der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier kontrolliert. Ausgeschüttelt wurde mit zweimal 10 ml CH_2Cl_2 . Anschließend wurden die beiden org. Phasen vereinigt und am Rotationsverdampfer auf 5 ml eingengt. Die org. Phase CH_2Cl_2 B₁ wurde wegen anschließendem schonenderen Konzentrierens hergestellt.

Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ (25%) 85:14:1
Laufzeit: 60 min
Laufhöhe: 13 cm
Detektion: UV 254 nm und 350 nm
Sprühreagenz: D 1, D 2, D 10
Auftragemenge: 10 μl

4. 1. 2. Mit einem Gemisch aus CH_2Cl_2 und EtOH als Laufmittel

Vergleichslösungen:

wie 1, aber ohne Testosteron- und Methyltestosteronlösung

Probe:

wie 1.

Bedingungen:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 95:5
Laufzeit: 35 min
Laufhöhe: 13 cm
Detektion: UV 254 nm und 350 nm
Sprühreagenz: D 1
Auftragemenge: 10 μl

4. 1. 3. Mit einem Butanol/Wasser/Eisessig-Gemisch als Laufmittel

Vergleichslösung:

2 Spatelspitzen des Testes sicc. pulv. Extraktes (Kanolt) wurden mit 5 ml 50 proz. MeOH versetzt und mit Hilfe von Ultraschall suspendiert. Die überstehende klare Lösung wurde zum Auftragen verwendet.

Probenlösung:

Der Inhalt einer Ampulle wurde mit 50 proz. MeOH auf 5 ml aufgefüllt.

Bedingungen:

Stat. Phase:	Kieselgel 60 F 254
Mobile Phase:	Butanol/H ₂ O/Eisessig 12:5:3
Laufzeit:	ca. 5 h
Laufhöhe:	14.5 cm
Detektion:	Sprühreagenz: D 22
Auftragemenge:	20 µl

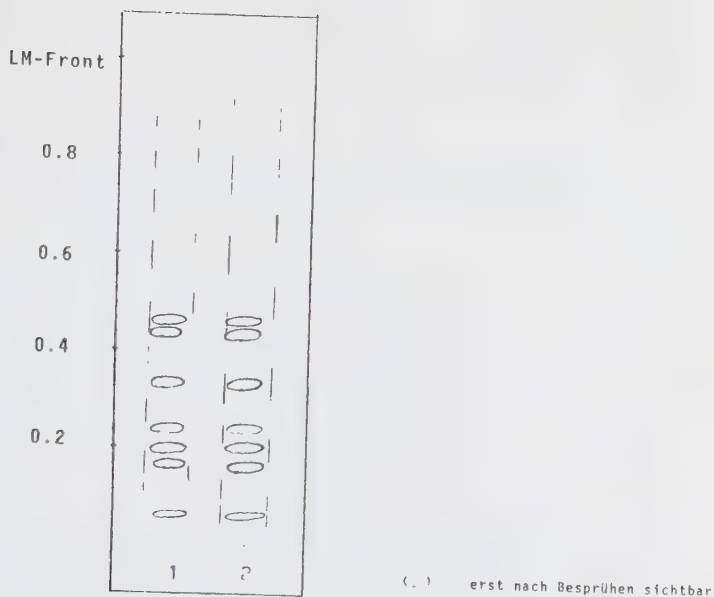


Abb. 54: DC der methanol.- wäßrigen Verdünnung einer Testifortan Ampulle sowie eines Testes-Extrakts zum Vergleich

1 = Probe, 2 = Vergleichslösung

(Bedingungen siehe S. 198)

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Bestimmung der in der Ampulle vorhandenen Reinsubstanzen Benzoessäure, Yohimbin-HCl, Papaverin-HCl und PHB-Propylester

Konz. der Eichlösung:

Benzoessäure: 1.912 mg

Yohimbin-HCl: 1.188 mg

Papaverin-HCl: 1.004 mg

PHB-Propylester: 0.24 mg

Codein-HCl: 1.25 mg

in 10 ml mobiler Phase

Probenaufbereitung:

Die Proben wurden nach 3 verschiedenen Verfahren aufbereitet:

- (a) 1 Ampulle wurde geöffnet, der Inhalt in einen Meßkolben übergeführt und die leere Ampulle mit wenig mobiler Phase nachgespült. Anschließend wurden 2 ml der Stammlösung des int. Standards ($\cong$ 1.25 mg Codein-HCl) zugegeben und mit mobiler Phase auf 10 ml aufgefüllt.
- (b) 1 Ampulle wurde zerstoßen und dann zusammen mit 2 ml der Stammlösung des int. Standards ($\cong$ 1.25 mg Codein-HCl) und wenig mobiler Phase (zur Abtrennung der Glasscherben) durch ein Filter gegossen. Dann wurde mit mobiler Phase auf 10 ml aufgefüllt.
- (c) Der geöffneten Ampulle wurde mit einer Vollpipette 1 ml Injektionslösung entnommen und in einem Meßkolben übergeführt. Nach der Zugabe von 1 ml der Stammlösung des int. Standards ($\cong$ 0.675 mg Codein-HCl) wurde mit mobiler Phase auf 5 ml aufgefüllt.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule

Mobile Phase: Acetonitril/Pentansulfonat-Natrium
0.01 M 40:60

Fluß: 0.5 ml/min

Papiervorschub: 0.5 cm/min
Detektion: UV 280 nm / 0.005 AUFS
Injektionsvol.: 50 μ l

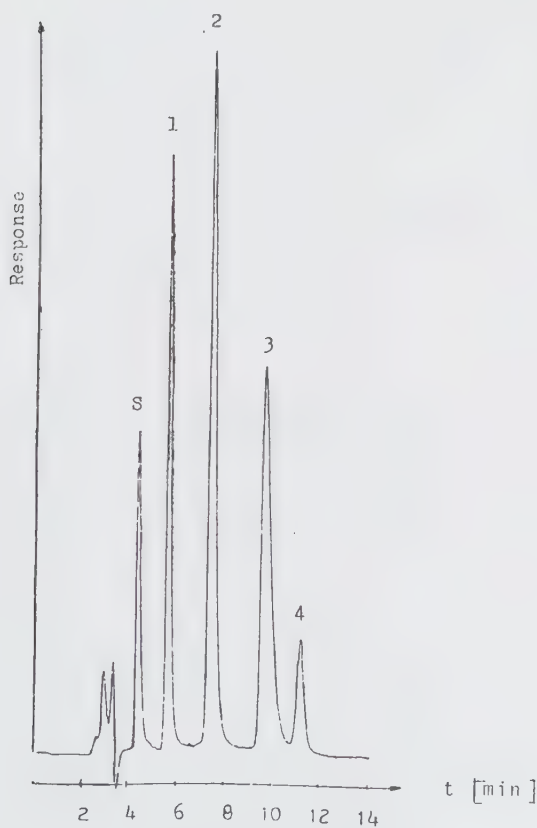


Abb. 55: Liquidchromatogramm einer Testifortan Ampulle zur Bestimmung von Benzoesäure, Yohimbin-HCl, Papaverin-HCl und PHB-Propylester
1 = Benzoesäure, 2 = Yohimbin-HCl, 3 = Papaverin-HCl, 4 = PHB-Propylester
(Bedingungen siehe S. 200/201)

Okasa®

(Fa. Medicator)

Aussehen:

Silberne Dragees mit ca. 9 mm Durchmesser

Wirkstoffe pro Dragee Okasa®:

Extr. Testes sicc.: 50 mg

Extr. Diencephalon sicc.: 10 mg

Thiamin-HCl: 2 mg

Riboflavin: 0.1 mg

Pyridoxin-HCl: 2 mg

DL- α -Tocophersolan* 2 mg

Calcium-D-pantothenat 1 mg

Ascorbinsäure 15 mg

Nicotinamid 10 mg

ferner:

Calciumcitrat 50 mg, Calciumphosphat 30 mg, Kaliumphosphat 10 mg, Magnesiumphosphat 10 mg, Eisen(II)-phosphat-octahydrat 2 mg, Kupfer-Natrium-citrat 0,005 mg, Ammoniummolybdat 0.006 mg, Manganlactat 0.05 mg, Zinkphosphat 0.1 mg, Calciumsilikat 1 mg, basischen Aluminiumacetat 0.5 mg

(nach Angaben des Herstellers)

1. Bisher beschriebene Analysenverfahren

Dünnschichtchromatographisch sind die in der Probe befindlichen Vitamine bereits untersucht worden ^{127, 128, 158}) und auch hochdruckflüssigchromatographische Bestimmungen wurden schon beschrieben ^{129, 130, 150}).

Bisher angegebene Bestimmungen von Testes- und Gehirn-Extrakten siehe S. 91. Nachweis und Bestimmung von Vitaminen in Tabletten und Dragees, die auch Extrakte aus tierischen Material enthalten, wurden bisher noch nicht publiziert.

* Die Löslichkeit sowie das chromatographische Verhalten (DC, HPLC) zeigen, daß es sich um Tocopherolsuccinat und nicht um Tocophersolan handelt.

2. Eigene Untersuchungen:

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis der wasserlöslichen Vitamine wurde auf Kieselgelplatten mit speziellen Sprühreagenzien und unterschiedlichen Laufmitteln im wäßrigen Auszug der Probe durchgeführt. Tocopherolsuccinat, welches teilweise zu freiem Tocopherol gespalten worden war, wurde in Dichlormethan- und Methanolauszügen der Probe nach Detektion mit Cer-(IV)-sulfatlösung auf einer Kieselgelplatte nachgewiesen.

Einen Hinweis auf das Vorhandensein von Organ-Extrakten ließ sich durch den Nachweis von Cholesterin im Dichlormethanauszug der Probe erbringen.

Die Detektion erfolgte mit Liebermann-Burchards Reagenz.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Alle Bestimmungen wurden auf reversed-phase Säulen durchgeführt. Die wasserlöslichen Vitamine (Thiamin-HCl, Riboflavin, Pyridoxin-HCl und Nicotinamid) wurden im wäßrigen Auszug der Probe mit einem Gemisch aus Acetonitril und Ionenpaarreagenztlösung als mobile Phase bestimmt. Als interner Standard eignete sich Theophyllin. Detektiert wurde im UV-Licht bei 270 nm. Calciumpantothenat wurde mit Hilfe einer Eichgeraden und durch Detektion mit einem Refraktometer bestimmt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Eisessig und Wasser benutzt. Tocopherolsuccinat und sein Hydrolyseprodukt Tocopherol ließen sich mit einem Methanol-Wasser Gemisch als mobile Phase mit methanolischen Auszug der Probe und Tocopherolacetat als interner Standard bestimmen. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 280 nm.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis der Vitamine sowie von Cholesterin erfolgte mit speziellen Sprühreagenzien und durch Entwicklung auf Kieselgel mit teilweise unterschiedlichen Laufmitteln. Die wasserlöslichen Vitamine wurden im wäBrigen Auszug, Tocopherolsuccinat im methanolischen und - wie Cholesterin - im CH_2Cl_2 -Auszug der Probe nachgewiesen.

LM 1: (siehe exp. Teil S. 209)

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 25	D 2
Vergleichssubstanzen					
Thiamin-HCl	0.27	+	-	+	
Ascorbinsäure	0.68	+	-		+
Pyridoxin-HCl	0.77	+	+		
Riboflavin	0.83	gelb	+		
Probe	0.27	+	-	+	
(wäBriger Auszug)	0.67	+	-		+
	0.77	+	+		+
	0.83	gelb	+		

Thiamin-HCl ließ sich als hellblaufluoreszierender Fleck nach dem Besprühen mit alkalischer Kaliumhexacyanoferratlösung unter dem UV-Licht bei 350 nm beobachten. Ascorbinsäure ergab mit Dichlorphenolindophenol einen weißen Fleck auf blauem Untergrund. Riboflavin fiel besonders durch seine gelbe Fluoreszenz bei Licht von 254 nm auf. Pyridoxin zeigte nach Besprühen mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und Natronlauge im Tageslicht eine hellblaue Färbung.

LM 2: (siehe exp. Teil S. 209)

	Rf-Wert	D 22
Vergleichssubstanz		
Calciumpantothenat	0.82	+
Probe		
(wäßriger Auszug)	0.80	+

Nach Besprühen mit Ninhydrin war Calciumpantothenat als blauviolette Färbung zu erkennen.

LM 3: (siehe exp. Teil S. 209)

	Rf-Wert	D 1
Vergleichssubstanz		
Nicotinamid	0.38	+
Probe	0.39	+

Nicotinamid konnte durch den Rf-Wert sowie die Orangefärbung nach Besprühen mit Dragendorffs Reagenz nachgewiesen werden.

LM 4: (siehe exp. Teil S. 209)

	Rf-Wert	D 4
Vergleichssubstanzen		
Tocopherolsuccinat	0.79	+
Tocopherol	0.95	+
Probe		
(CH ₂ Cl ₂ -Auszug)	0.79	+
	0.98	+
Probe		
(MeOH-Auszug)	0.79	+
	0.95	+

Sowohl Tocopherol als auch Tocopherolsuccinat zeigten nach Besprühen mit Cer(IV)-sulfatlösung eine blaurotviolette Färbung. Beide waren in den Probenauszügen eindeutig nachzuweisen.

LM 5: (siehe exp. Teil S. 209)

	Rf-Wert	D 2
Vergleichssubstanz		
Cholesterin	0.56	+
Probe	0.56	+

Durch die rote Färbung mit Liebermann-Burchard Reagenz konnte Cholesterin eindeutig nachgewiesen werden. Nachweis von Cholesterin (siehe Extrakte tierischen Ursprungs S. 91)

Das nicht zur Verfügung stehende Extr. Diencephalon dürfte ebenfalls Cholesterin enthalten.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Thiamin-HCl, Pyridoxin-HCl, Ascorbinsäure, Nicotinamid und Riboflavin

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Ascorbinsäure	3.13 ± 0.02	0.5
Nicotinamid	5.36 ± 0.04	1.5
Pyridoxin-HCl	7.70 ± 0.20	2.6
Theophyllin		
(int. St.)	9.60 ± 0.20	3.5
Thiamin-HCl	12.80 ± 0.20	5.0
Riboflavin	22.00 ± 0.30	9.2

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Ascorbinsäure:	Nicotinamid:
$\bar{x} = 17.08 \text{ mg}$	$\bar{x} = 10.90 \text{ mg}$
s = 0.261	s = 0.363
VK = 1.53	VK = 3.33

Pyridoxin-HCl:	Thiamin-HCl:
$\bar{x} = 2.13 \text{ mg}$	$\bar{x} = 2.18 \text{ mg}$
$s = 0.017$	$s = 0.108$
VK= 0.80	VK= 4.95

Riboflavin:
 $\bar{x} = 0.095 \text{ mg}$
 $s = 0.004$
VK= 0.42

Wiederfindung:

Ascorbinsäure:	99.1%
Nicotinamid:	99.0%
Pyridoxin-HCl:	96.0%
Thiamin-HCl	97.0%
Riboflavin:	102.6%

Aufgrund der gleichen Integration bei Eichlösung und Probe waren auch ohne Basislinientrennung, aber bei kürzerer Analysenzeit, reproduzierbare Ergebnisse erzielbar. Darüberhinaus konnte die Bestimmung unter isokratischen Bedingungen durchgeführt werden.

3. 2. 2. Bestimmung von Calciumpantothenat

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Calciumpantothenat	3.80 ± 0.20	1.1

Ermittelte Werte:
(n = 4)

$\bar{x} = 0.944 \text{ mg}$
 $s = 0.045$
VK= 4.77

Erläuterung zur Bestimmung siehe Repursan S. 240

3. 2. 3. Bestimmung von Tocopherolsuccinat sowie Tocopherol

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Tocopherolsuccinat	9.00 $\pm$ 0.10	3.5
Tocopherol	10.35 $\pm$ 0.10	4.2
Tocopherolacetat	12.75 $\pm$ 0.10	5.4

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Tocopherolsuccinat:	Tocopherol:
$\bar{x}$ = 1.80 mg	$\bar{x}$ = 0.30 mg
s = 0.050	s = 0.02
VK= 2.77	VK= 6.66

Wiederfindung:

Tocopherolsuccinat: 94.5%

Tocopherol: 97.4%

Tocopherolsuccinat war teilweise hydrolysiert worden und lag als freies Tocopherol vor. Da sich das Verhältnis von Succinat zeitabhängig änderte und auch nach Lösen der Probe in einem anderen Lösungsmittel (CH_2Cl_2) beide Verbindungen nachweisbar waren (siehe auch DC S.205) war offensichtlich nicht meine Probenaufarbeitung die Ursache der Hydrolyse.

Die Summe aus Succinat und Tocopherol (2.1 mg) entspricht ungefähr der Menge des zu erwartenden Tocopherolsuccinats.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

Die Vergleichssubstanzen wurden in den gleichen Lösungsmitteln wie die Probe gelöst. Die Konzentrationen

nen entsprachen den in der Probe zu erwartenden Mengen.

Zum Nachweis von Cholesterin wurde eine 2 proz. Lösung von Cholesterin in CH_2Cl_2 verwendet.

Probe:

1 Dragee wurde im Mörser pulverisiert, mit 10 ml H_2O , MeOH oder CH_2Cl_2 versetzt und ultrabeschallt. Das Filtrat der Suspension wurde anschließend schonend auf 1 ml eingengt.

Zum Nachweis von Tocopherolsuccinat und Tocopherol wurde auch ein nicht eingengtes Filtrat aufgetragen.

Bedingungen:

Stat. Phase:

Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase:

LM 1: MeOH/Pyridin/Eisessig 80:15:5

LM 2: Isopropanol/ H_2O /Eisessig 80:15:5

LM 3: CH_2Cl_2 /MeOH/ NH_3 (25%) 85:14:1

LM 4: CHCl_3 /EtOH 80:20

LM 5: EtOH/ CH_2Cl_2 7.5:100

Laufzeit/Laufhöhe: LM 1: 60 min / 13.5 cm

LM 2: 110 min / 9.8 cm

LM 3: 60 min / 13.5 cm

LM 4: 120 min / 11.0 cm

LM 5: 60 min / 12.0 cm

Detektion:

LM 1: D 25 (350 nm), D 23, D 26

LM 2: D 22

LM 3: D 1

LM 4: D 4

LM 5: D 2

Auftragemenge:

20 μl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Thiamin-HCl, Pyridoxin-HCl, Ascorbinsäure und Riboflavin

Konz. der Eichlösung:

Thiamin-HCl:	2.03 mg
Riboflavin:	0.112 mg
Ascorbinsäure:	14.57 mg
Pyridoxin-HCl:	2.01 mg
Nicotinamid:	10.20 mg
Theophyllin (int. St.):	0.493 mg
in 10 ml H ₂ O	

Probenaufbereitung:

1 Dragee wurde im Mörser zerrieben, mit 1 ml der Stammlösung des int. Standards (≈ 0.0493 mg Theophyllin) versetzt und dann mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend wurde unter Ultraschall suspendiert und ein Teil filtriert.

Bedingungen:

Säule:	Lichrospher 100 CH-8/2 (125-4) + Vor
Mobile Phase:	CH ₃ CN/Pentansulfonat-Natrium 0.005 M 8:92
Fluß:	0.5 ml / min
Papiervorschub:	0.3 cm / min
Detektion:	UV 270 nm / 0.01 AUFS
Injektionsvol.:	10 µl

Eichlösung

Probe

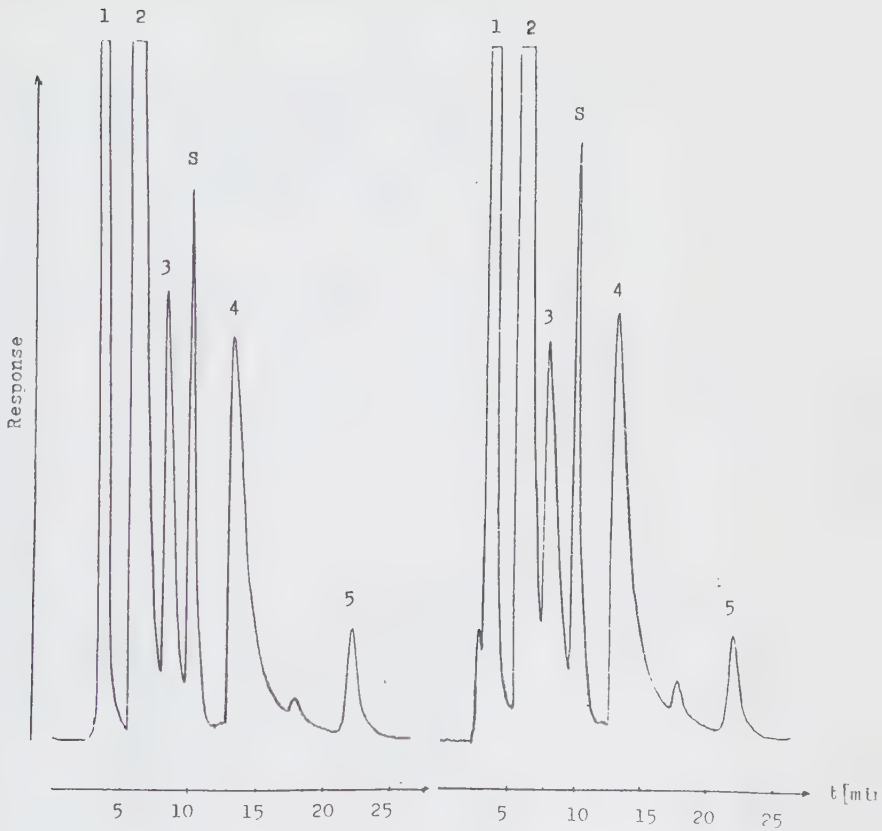


Abb. 56: Liquidchromatogramme der Eichlösung und des wässrigen Auszugs eines Okasa[®] Dragees zur Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine.

1 = Ascorbinsäure, 2 = Nicotinamid, 3 = Pyridoxin-HCl,
4 = Thiamin-HCl, 5 = Riboflavin, S = Theophyllin
(int. St.) (Bedingungen siehe S.210)

4. 2. 2. Bestimmung von Calciumpantothenat

Erstellung der Eichgeraden:

siehe Repursan S.240

Probenaufarbeitung:

5 Dragees wurden im Mörser zerrieben, mit 5 proz. Eisessig auf 10 ml aufgefüllt und unter Ultraschall suspendiert. Die Suspension wurde eingengt und das Filtrat chromatographiert.

Bedingungen:

siehe Repursan S. 240



Abb. 57: Liquidchromatogramm eines wäBrig.-essigsauen Auszugs von Okasa[®] Dragees zur Bestimmung von Ca-Panthenat

1 = Pantothensäure

(Bedingungen siehe S. 240)

Vergleichslösung (Liquidchromatogramm) und Eichgerade siehe Repursan S. 240

4. 2. 3. Bestimmung von Tocopherolacetat und Tocopherol

Konz. der Eichlösung:

D,L- α -Tocopherolsuccinat:	2.19 mg
D,L- α -Tocopherol:	1.37 mg
D,L- α -Tocopherolacetat:	1.96 mg
in 10 ml MeOH	

Probenaufarbeitung:

1 Dragee wurde im Mörser pulverisiert und in einem Meßkolben übergeführt. Nach Zugabe von 1 ml der Stammlösung des int. Standards (≈ 1.96 mg Tocopherolacetat) wurde auf 10 ml mit MeOH aufgefüllt und ultrabeschallt.

Die Suspension wurde dann filtriert.

Bedingungen:

Säule:	Lichrospher 100 CH-8 + Vorsäule
Mobile Phase:	MeOH/H ₂ O 96:4
Fluß:	0.4 ml / min
Papiervorschub:	0.3 cm / min
Detektion:	UV 280 nm / 0.005 AUFS
Injektionsvol.:	10 μ l

Eichlösung

Probe

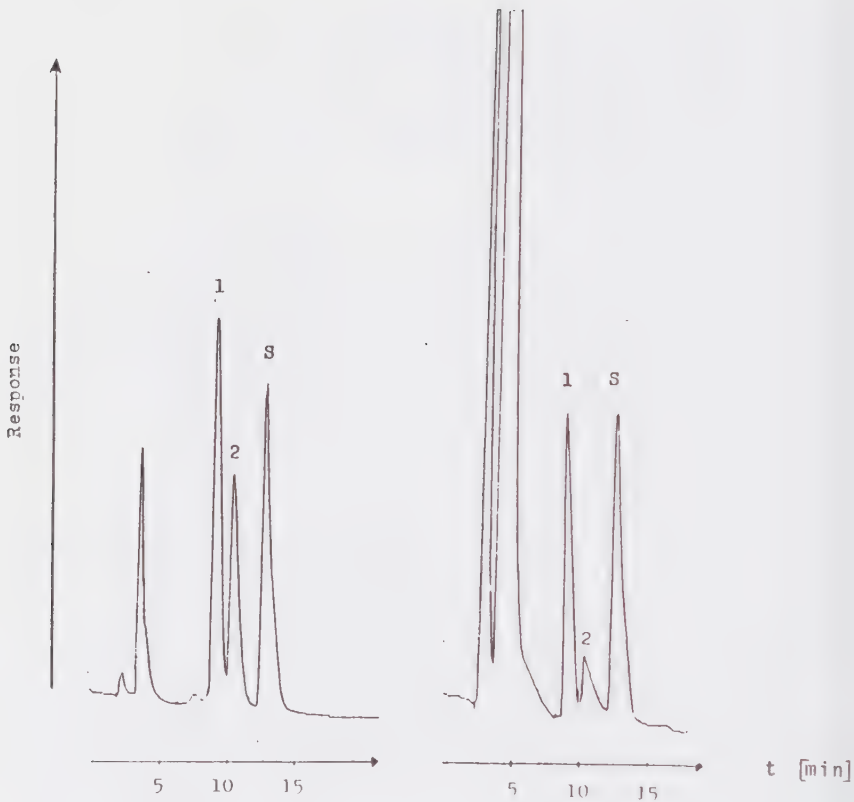


Abb. 58: Liquidchromatogramme der Eichlösung und eines methanol. Auszugs eines Okasa^(R) Dragees zur Bestimmung von Tocopherol und Tocopherolsuccinat. 1 = Tocopherolsuccinat, 2 = Tocopherol, S = Tocopherolacetat (int. St.) (Bedingungen siehe S. 213)

- d) Arzneimittel mit Reinsubstanzen, pflanzlichen- und Organ-Extrakten

Okasagold[®]

(Fa. Medicator)

Aussehen:

Hellbraune Dragees mit ca. 9 mm Durchmesser

Wirkstoffe pro Dragees:

Bei Okasagold sind die gleichen Wirkstoffe angegeben wie bei Okasa (siehe S. 202), mit Ausnahme des in Okasa enthaltenen Testes-Extraktes, der in Okasagold durch die gleiche Menge eines Placenta-Extraktes (Extr. Placenta sicc.) ersetzt wurde; Okasagold enthält darüberhinaus noch 10 mg eines Hopfen-Extrakts (Extr. Humuli Lupuli spir. sicc. 5:1) pro Dragee.

1. Bisher beschriebene Analysenverfahren

Vitamine: siehe Okasa S. 202

Extrakte aus tierischen Material: siehe S. 91

Dünnschicht- und hochdruckflüssigchromatographisch wurden in Hopfen-Extrakten Bittersäuren nachgewiesen und bestimmt (siehe Hopfen-Extrakt S. 86)

Der Nachweis dieser Bittersäure in Dragees, die sehr geringe Mengen Extrakt enthalten neben Extrakten tierischen Ursprungs, wurde noch nicht durchgeführt.

2. Eigene Untersuchung

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Vitamine und Cholesterin: siehe Okasa S. 202

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Bestimmung der Vitamine: siehe Okasa S. 202

Der Nachweis des Hopfen-Extrakts wurde durch Chromatographie der für Hopfen charakteristischen α - und β -Säuren durchgeführt. Dazu wurde der Etherauszug von Okasagold[®] Dragees auf einer reversed-phase Säule mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Phosphorsäure als mobile Phase und UV-Detektion bei 314 nm analysiert.
(Vergleichs-Extrakt, siehe Hopfen-Extrakt S. 86)

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

Ich erhielt die gleichen Ergebnisse wie bei Okasa (siehe S. 202). Die Bittersäuren der geringen Mengen Hopfen-Extrakt lagen bei der Dünnschichtchromatographie unterhalb der Nachweisgrenze.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Thiamin-HCl, Pyridoxin-HCl, Ascorbinsäure, Nicotinamid und Riboflavin

Retentionszeiten: siehe Okasa S. 206

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Ascorbinsäure:	Nicotinamid:
$\bar{x}$ = 15.62 mg	$\bar{x}$ = 10.57 mg
s = 1.18	s = 0.683
VK= 7.55	VK= 6.46

Pyridoxin-HCl:	Thiamin-HCl:
$\bar{x} = 1.85 \text{ mg}$	$\bar{x} = 1.88 \text{ mg}$
$s = 0.119$	$s = 0.038$
$VK = 6.54$	$VK = 2.02$

Riboflavin:
 $\bar{x} = 0.098 \text{ mg}$
 $s = 0.074 \text{ mg}$
 $VK = 7.55 \text{ mg}$

Wiederfindung:
siehe Okasa S. 207

3. 2. 2. Bestimmung von Calciumpantothenat

Retentionszeit:
siehe Okasa S. 207

Ermittelte Werte:
($n = 4$)

$\bar{x} = 0.955 \text{ mg}$
 $s = 0.016$
 $VK = 1.68$

3. 2. 3. Bestimmung von Tocopherolsuccinat sowie Tocopherol

Retentionszeiten:
siehe Okasa S. 208

Ermittelte Werte:
($n = 4$)

Tocopherolsuccinat:	Tocopherol:
$\bar{x} = 1.36 \text{ mg}$	$\bar{x} = 0.85 \text{ mg}$
$s = 0.017$	$s = 0.016$
$VK = 1.27$	$VK = 1.87$

Wiederfindung:

siehe Okasa S. 208

In Okasagold ^(R) Dragees lagen nur noch 61% des Tocopherols als Tocopherolsuccinat vor. In den Okasa ^(R) Dragees waren es noch 85%.

3. 2. 4. Nachweis von Hopfen-Extrakt

Im Chromatogramm des Etherauszugs konnten die Hopfenbittersäuren in Form charakteristischer Peaks nachgewiesen werden.

	Retentionszeit [min]
Cohumulon	10.98
Adhumulon +	
Humulon	13.21
Colupulon	17.53
Adlupulon +	
Lupulon	21.80

Eine quantitative Bestimmung ist wegen der großen Instabilität der Bittersäure wenig aussagekräftig. Schon die unterschiedlich lange Lagerzeit des gleichen Extrakts kann zu erheblichen Unterschieden in der Konzentration der Bittersäuren führen ^{31,117)}.

4. Ergebnisse

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Herstellung der Vergleichslösungen, Probenaufbereitung und Bedingungen siehe Okasa S. 208/209

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Thiamin-HCl, Pyridoxin-HCl, Ascorbinsäure und Riboflavin

Konzentration der Eichlösung und Probenaufarbeitung sowie Bedingungen siehe Okasa S. 210

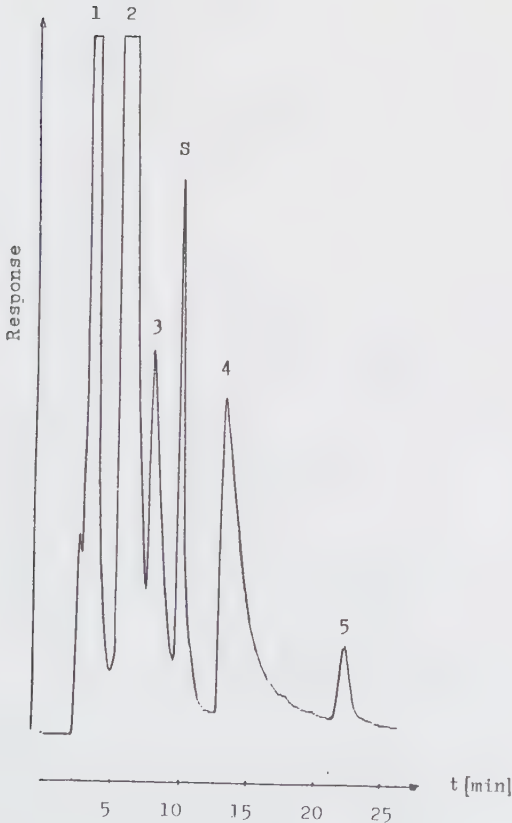


Abb. 59: Liquidchromatogramm eines wäßrigen Auszugs von Okasagold[®] Dragees zur Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine
1 = Ascorbinsäure, 2 = Nicotinamid, 3 = Pyridoxin-HCl,
4 = Thiamin-HCl, 5 = Riboflavin, S = Theophyllin (int.St.
(Bedingungen siehe S. 210)

4. 2. 2. Bestimmung von Calciumpantothenat

Erstellung der Eichgeraden:
siehe Repursan S. 240

Probenaufarbeitung:
siehe Okasa S.212

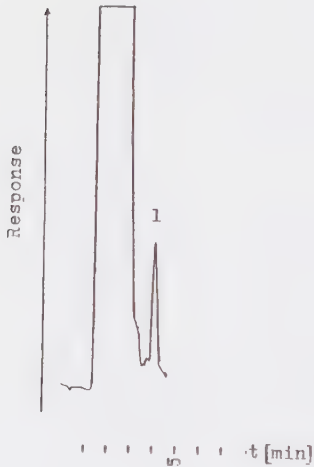


Abb. 60: Liquidchromatogramm eines wäßrig-essigsauen Auszug
von Okasagold[®] Dragees zur Bestimmung von Ca-Pantot
1 = Pantothensäure
(Bedingungen siehe Repursan S. 240)

Verdünnungslösungen (Liquidchromatogramm) und Eichge
siehe Repursan

4. 2. 3. Bestimmung von Tocopherolsuccinat und Tocopherol

Konzentration des Eichgemisches und Probenaufberei-
tung sowie Bedingungen siehe Okasa S. 213

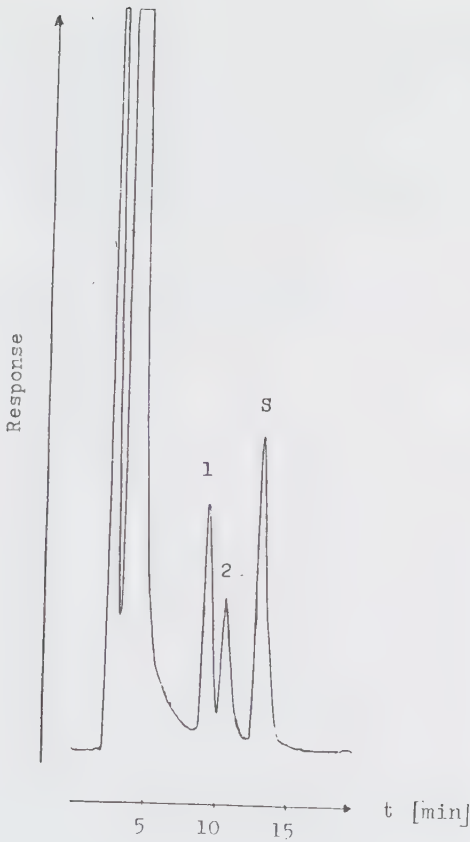


Abb. 61: Liquidchromatogramm des methanol. Auszugs eines Okasagold[®] Dragees zur Bestimmung von Tocopherol und Tocopherolsuccinat.

1 = Tocopherolsuccinat, 2 = Tocopherol, S = Tocopherolacetat (int. St.)

Bedingungen und Liquidchromatogramm der Eichlösung siehe Okasa S. 214

4. 2. 4. Nachweis von Hopfen-Extrakt in Okasagold[®]

Aufarbeitung eines Hopfen-Extrakts zu Vergleichszwecken siehe Hopfen-Extrakt S. 89

Probenaufarbeitung:

10 Dragees wurden im Mörser zerrieben und dann 2 h am Soxhlet mit ca. 120 ml Ether extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend eingedampft und in 5 ml MeOH aufgenommen. Das Filtrat dieser methanol. Suspension wurde dann in den Chromatographen injiziert.

Bedingungen und Liquidchromatogramm des Vergleichs-Extrakts siehe Hopfen-Extrakt S. 89

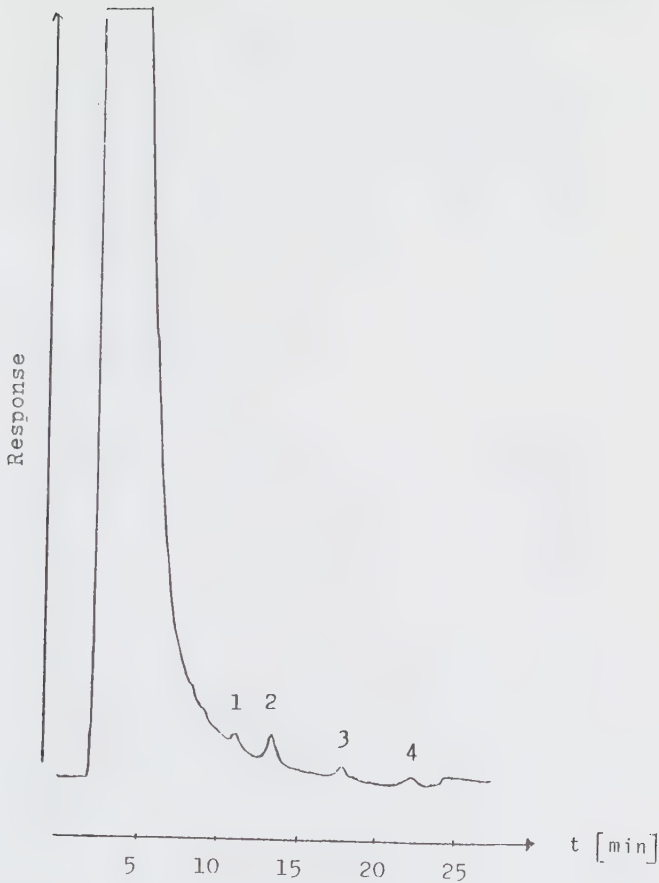


Abb. 62: Liquidchromatogramm des Etherauszugs von 10 Dragees Okasagold[®] zum Nachweis des Hopfen-Extrakts mit Hilfe der Bittersäuren.
1 = Cohumulon, 2 = Adhumulon + Humulon, 3 = Colupulon, 4 = Adlupulon + Lupulon
(Bedingungen siehe Hopfen-Extrakt S. 89)

Repursan^(R)

(Biokanol Arzneimittel GmbH)

Aussehen:

braune Dragees mit ca. 9 mm Durchmesser

Wirkstoffe pro Dragee:

Extr. Yohimbe sicc.,	30 mg
Extr. Muira Puama sicc.:	5 mg
Extr. Testes sicc. pulv. (7:1):	50 mg
Extr. Colae sicc.:	30 mg
Extr. Cerebrum sicc. pulv. (4.5:1):	5 mg
Lecitin (90/95%):	20 mg
Guaifenesin:	30 mg
Vitamin-A-acetat:	100 I.E. ($\approx 34.4 \mu\text{g}$)
Thiaminhydrochlorid:	0.25 mg
Riboflavin:	0.25 mg
Ascorbinsäure:	12.5 mg
Vitamin-E-acetat:	1 I.E. ($\approx 1.0 \text{ mg}$)
Calciumpantothenat:	3.75 mg
Nicotinamid:	3.5 mg
Rutin:	2.5 mg

ferner:

Calciumglycerophosphat 10 mg, Kupfersulfat 0.2 mg,
Eisen-(II)-sulfat 1.5 mg, Mangan-(II)-sulfat-hydrat 0.15 mg,
Kaliumsulfat 1.0 mg, Zinksulfat 0.2 mg, Magnesium-
sulfat 1.0 mg, Kobalt-(II)-sulfat 0.05 mg, Kaliumjodid 0.025 mg

1. Bisher beschriebene analytische Verfahren

Dünnschichtchromatographisch wurden alle im Repursan befindlichen Substanzen als Reinsubstanzen oder auch im Beisein anderer Substanzen analysiert. (127,128,158). Hochdruckflüssigchromatographische Untersuchungen der Vitamine sind mit unterschiedlichen Säulen und mobilen Phasen z.B. in Multivitamin-tabletten oder in anderen pharmazeutischen Präparaten beschrieben worden (129,30, 159-160); Rutin wurde in Arzneidrogen bestimmt (162)

und auch für Guaifenesin 151,153,163), Yohimbin (siehe Yohimbe-Extrakt S. 20) und Coffein (siehe Cola-Extrakt S. 69) wurden HPLC-Analysenmethoden angegeben. Diese Substanzen wurden jedoch bisher noch nicht in einer so kompliziert zusammengesetzten Mischung analysiert, wie sie im Repursan zu finden ist. Hier hat man - therapeutisch wenig sinnvoll - 10 organische Wirkstoffe mit 13 anorganischen Ionen, 3 pflanzlichen Extrakten und 2 Extrakten tierischen Ursprungs kombiniert.

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis von allen angegebenen organischen Inhaltsstoffen sowie der Wirkstoffe in den Drogen-Extrakten, soweit sie bekannt sind, ließ sich auf Kieselgelplatten mit speziellen Sprühreagenzien und (z.T.) unterschiedlichen Laufmitteln durchführen. Im wäßrigen Auszug der Probe konnten mehrere wasserlöslichen Vitamine (Thiamin, Riboflavin, Ascorbinsäure, Ca-Pantothenat) sowie Rutin nachgewiesen werden, im Dichlormethanauszug waren die Acetate der fettlöslichen Vitamine Retinol und Tocopherol zu finden. Im ethanolischen Auszug ließen sich die Alkaloide Coffein und Yohimbin sowie Nicotinamid nachweisen, im methanolischen Auszug Guaifenesin und Lecithin (genaue Angaben der Sprühreagenzien und Laufmitteln siehe exp. Teil S. 234) Als Hinweis auf das Vorkommen von Extrakten aus tierischen Organen ist der Nachweis von Cholesterin im Dichlormethanauszug anzusehen, der nach chromatographischer Entwicklung und anschließender Detektion mit Liebermann-Burchards Reagenz gelingt.

2. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

Bei allen Bestimmungen wurden reversed-phase Säulen benutzt. Der Gehalt an Rutin wurde im methanol. Auszug der Probe mit Hyperosid als interner Standard und einem Gemisch aus Acetonitril, Wasser und Eisessig als mobile Phase und durch UV-Detektion bei 350 nm ermittelt. Die wasserlöslichen Vitamine (Thiamin, Riboflavin, Ascorbinsäure und Nicotinamid) sowie Coffein und Guaifenesin wurden im wäßrigen Auszug der Probe mit einem Gemisch aus Acetonitril und Ionenpaarreagenzlösung als mobile Phase bestimmt. Als interner Standard diente Pyridoxin-HCl und detektiert wurde mit UV-Licht bei 270 nm.

Calciumpantothenat wurde wegen zu geringer Absorption bei dieser Wellenlänge extern mit Hilfe einer Eichgeraden und Detektion mit einem Refraktometer bestimmt, wobei als mobile Phase ein Gemisch von Eisessig und Wasser verwendet wurde. Retinolacetat und Tocopherolacetat ließen sich nach der Extraktion der Probe mit einem Gemisch aus Methanol und Dichlormethan und Vitamin D₃ als interner Standard nachweisen und bestimmen; dabei wurde ein Acetonitril/Wasser Gemisch als mobile Phase verwandt. Zur Detektion war ein UV-Detektor geeignet, dessen Wellenlänge nach der Elution von Retinolacetat für die Detektion von Vitamin D₃ und Tocopherolacetat von 330 nm auf 288 nm verändert wurde. Yohimbin konnte mit Valium^(R) als interner Standard und einem Gemisch aus Acetonitril und basischem Ammoniumformiat-Puffer als mobile Phase bei Gradientenelution und einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt werden.

3. Ergebnisse

3. 1. Dünnschichtchromatographie

Bei der Auswertung der Chromatogramme zum Nachweis der angegebenen Substanzen war UV-Licht (254 nm und 350 nm) wenig hilfreich, da die Probenauszüge auf der Platte über die gesamte Laufstrecke ein nicht mehr in einzelne Flecken zu trennendes Band zeigten. Ich habe deshalb nur die Rf-Werte der Flecken angegeben, die mit dem verwendeten Sprühreagenz eine eindeutige Färbung ergaben.

3. 1. 1. Nachweis von angegebenen Reinsubstanzen bzw. bekannten Wirksubstanzen in den Extrakten.

DC 1 (siehe exp. Teil S. 234)

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 25	D 23	D 15
Vergleichssubstanzen						
Thiamin-HCl	0.25	+	-	+		
Ascorbinsäure	0.75	+	-		+	
Riboflavin	0.80	+	gelb			
Rutin	0.84					+
Probe	0.25	+	-	+		
(wäßriger Auszug)	0.75	+	-		+	
	0.80	+	gelb			
	0.84	+	-			+

Im wäßrigen Auszug konnte Thiaminhydrochlorid unter UV-Licht von 350 nm als blau fluoreszierender Fleck identifiziert werden. Ascorbinsäure ergab mit dem Dichlorphenolindophenol Sprühreagenz einen weißen Fleck auf blauen Untergrund. Riboflavin war unter UV-Licht bei beiden Wellenlängen durch die charakteristische gelbe Fluoreszenz nachzuweisen. Rutin lieferte mit dem modifizierten Naturstoff Reagenz unter UV-Licht bei 350 nm eine orange Färbung.

DC 2 (siehe exp. Teil S. 234)

	Rf-Wert	D 22
Vergleichssubstanz		
Calciumpantothenat 0.80		+
Probe (wäßriger	0.01-0.04	+
Auszug)	0.79	+

Die Probe und die Vergleichssubstanz zeigten nach dem Besprühen mit Ninhydrin bei nahezu gleichem Rf-Wert eine violette Färbung.

DC 3 (siehe exp. Teil S. 234)

	Rf-Wert	D 9
Vergleichssubstanz		
Lecithin	0.03	+
Probe (methanol, 0.03		+
Auszug)	0.92	+

Lecithin konnte nach dem Besprühen mit Molybdatophosphat im unteren Rf-Bereich als dunkelblauer Fleck nachgewiesen werden.

DC 4 (siehe exp. Teil S. 234)

	Rf-Wert	D 21
Vergleichssubstanz		
Guaifenesin	0.77	+
Probe (CH ₂ Cl ₂ -		
Auszug)	0.77	+
Probe (methanol.	0.01-0.04	+
Auszug)	0.77	+

Guaifenesin konnte sowohl im CH₂Cl₂-Auszug als auch im MeOH-Auszug der Probe nach Besprühen mit KMnO₄-Sprühreagenz als graublauer Fleck nachgewiesen werden.

DC 5 (siehe exp. Teil S. 234)

	Rf-Wert	D 4	D 24
Vergleichssubstanzen			
Tocopherolacetat	0.40	+	
Retinolacetat	0.64		+
Probe (CH_2Cl_2 -	0.01-0.04	+	-
Auszug)	0.42	+	
	0.64		+

Im CH_2Cl_2 -Auszug der Probe war Tocopherol-acetat eindeutig nach Besprühen mit $\text{Ce}(\text{IV})\text{-SO}_4$ -Lösung als violetter Fleck nachzuweisen. Vitamin-A-acetat war, nach Besprühen mit SbCl_3 , als blauer Fleck erkennbar.

DC 6 (siehe exp. Teil S. 234)

	Rf-Wert	UV 254 nm	350 nm	D 1
Vergleichssubstanzen				
Nicotinamid	0.42	+	-	+
Yohimbin-HCl	0.65	+	+	+
Coffein	0.82	+	-	+
Probe (ethanol.	0.42	+	-	+
Auszug)	0.53	+	+	+
	0.57	+	+	+
	0.59	+	+	+
	0.65	+	+	+
	0.82	+	-	+

Nach Besprühen mit Dragendorffs Reagenz konnten Nicotinamid, Yohimbin (aus Yohimbe-Extrakt) und Coffein (aus Cola-Extrakt) im ethanol. Auszug der Probe nachgewiesen werden. Weitere Flecken mit Dragendorffs Färbung stammen von Nebenkalkaloiden des Yohimbins im Yohimbe-Extrakt.

3. 1. 2. Nachweis von Cholesterin als Hinweis auf Extrakte tierischen Ursprungs

DC 7 (siehe exp. Teil S.234)

	Rf-Wert	D 2
Vergleichssubstanzen		
Cholesterin	0.55	+
Probe (CH ₂ Cl ₂ -Auszug)	0.55	+

Der Nachweis von Cholesterin (rote Färbung mit Liebermann-Burchards Reagenz und gleicher Rf-Wert wie die Vergleichssubstanz) spricht für Extrakte tierischen Ursprungs.

3. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

3. 2. 1. Bestimmung von Rutin

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Rutin	7.39 $\pm$ 0.03	2.2
Hyperosid (int. St.)	9.30 $\pm$ 0.06	3.0

Ermittelte Werte:

(n = 4)

$\bar{x}$ = 2.399 mg

s = 0.0445

VK= 1.86

Wiederfindung: 98.2%

Die Bestimmung von Rutin ließ sich in 10 Minuten durchführen. Da bei relativ großer Wellenlänge (340 nm) detektiert wurde, fehlten im Chromatogramm störende Peaks.

3. 2. 2. Bestimmung von Ascorbinsäure, Nicotinamid, Thiaminhydrochlorid, Coffein, Riboflavin und Guaifenesin.

	Retentionszeit [min]
Ascorbinsäure	5.72 $\pm$ 0.03
Nicotinamid	9.41 $\pm$ 0.04
Pyridoxinhydrochlorid (int. St.)	12.57 $\pm$ 0.05
Thiaminhydrochlorid	17.31 $\pm$ 0.05
Coffein	24.10 $\pm$ 0.20
Riboflavin	26.51 $\pm$ 0.24
Guaifenesin	28.02 $\pm$ 0.20

Ermittelte Werte:
(n = 4)

Ascorbinsäure:	Nicotinamid:
$\bar{x}$ = 12.75 mg	$\bar{x}$ = 3.78 mg
s = 0.75	s = 0.19
VK= 5.88	VK= 5.02

Thiaminhydrochlorid:	Coffein:
$\bar{x}$ = 0.173 mg	$\bar{x}$ = 3.22 mg
s = 0.002	s = 0.16
VK= 1.15	VK= 4.96

Riboflavin:	Guaifenesin:
$\bar{x}$ = 0.281 mg	$\bar{x}$ = 28.46 mg
s = 0.005	s = 0.80
VK= 1.89	VK= 2.81

Wiederfindung:

Ascorbinsäure:	102.6%
Nicotinamid:	99.5%
Thiaminhydrochlorid	100.8%
Coffein:	99.6%
Riboflavin:	101.5%
Guaifenesin	99.8%

Die Basislinientrennung der 7 Substanzen dauerte unter isokratischen Bedingungen 30 Minuten. Nicotinamid, Pyridoxin und Thiamin bildeten ein Ionenpaar. Die Probe mußte rasch analysiert werden, da sich Ascorbinsäure in dieser Lösung sehr schnell zersetzte. (Diagramm: Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration als Funktion der Zeit siehe exp. Teil S.238)

3. 2. 3. Bestimmung von Calciumpantothenat

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Calciumpantothenat	3.80 ± 0.20	1.1

Ermittelte Werte:

(n = 4)

$\bar{x} = 3.713 \text{ mg}$

s = 0.078

VK= 2.02

Zwischen der Änderung der Konzentration an Calciumpantothenat und der Peakfläche bestand ein linearer Zusammenhang. (siehe Eichgerade exp. Teil S.241)

Die Analyse dauerte nur 5 Minuten. Nach 4 Einspritzungen war jedoch eine Unterbrechung von einer halben Stunde notwendig, da dann ein weiterer Peak pro Einspritzung (Retentionszeit: 28 min) im Chromatogramm auftrat, der von anderen, ebenfalls in Eisessig/H₂O löslichen Dragee-Bestandteilen stammte.

3. 2. 4. Bestimmung von Retinolacetat und Tocopherolacetat

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Retinolacetat	3.90 ± 0.10	6.8
Vitamin D ₃ (int. St.)	8.90 ± 0.15	16.8
Tocopherolacetat	17.70 ± 0.25	34.4

Ermittelte Werte:

(n = 4)

Retinolacetat:

$\bar{x}$ = 0.0435 mg $\hat{=}$ 126 I.E. $\bar{x}$ = 0.988 mg $\hat{=}$ 0.99 I.E.

s = 0.0014

s = 0.059

VK= 3.22

VK= 5.97

Wiederfindung:

Retinolacetat: 90.7%

Tocopherolacetat: 96.8%

3. 2. 5. Bestimmung von Yohimbin

	Retentionszeit [min]	k'-Wert
Yohimbin	11.38 $\pm$ 0.06	5.3
Valium (int. St.)	16.30 $\pm$ 0.20	8.0

Ermittelte Werte:

(n' = 4)

$\bar{x}$ = 0.233 mg

s = 0.009

VK= 3.99

Wiederfindung: 100.8%

Die Eichung mit Yohimbin führte bei tangentialer Peakauswertung zu den gleichen Ergebnissen wie die Eichung mit einem Yohimbe-Extrakt mit bekanntem Yohimbingehalt.

4. Experimenteller Teil

4. 1. Dünnschichtchromatographie

Vergleichslösungen:

Vergleichssubstanzen und Probe wurden in den gleichen Lösungsmitteln gelöst; die Konzentrationen entsprachen der Probenlösung.

Zum Nachweis von Cholesterin wurde eine 1 proz. Lösung von Cholesterin in CH_2Cl_2 verwendet.

Probe:

Jeweils 1 Dragee wurde im Mörser zerrieben, mit 10 ml H_2O , MeOH, EtOH oder CH_2Cl_2 versetzt und unter Ultraschall suspendiert. Das Filtrat wurde anschließend auf 1 ml am Rotationsverdampfer eingengt.

Zum Nachweis von Cholesterin wurden 10 Dragees im Mörser zerrieben und 2 h am Soxhlet mit 120 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Der Extrakt wurde einrotiert und mit 10 ml CH_2Cl_2 versetzt.

Bedingungen:

Stat. Phase: D 1 - D 7 Kieselgel 60 F 254

Mobile Phase: DC 1: MeOH/Pyridin/Eisessig 80:15:5

DC 2: Isopropanol/ H_2O /Eisessig 80:15:5

DC 3: CHCl_3 /EtOH/ H_2O 80:20:4

DC 4: CHCl_3 /EtOH 80:20

DC 5: Cyclohexan/Ether 80:20

DC 6: CH_2Cl_2 /MeOH/ NH_3 (25%) 85:14:1

DC 7: EtOH/ CH_2Cl_2 7.5:100

Laufzeit/

Laufhöhe: DC 1: 60 min / 13.3 cm
DC 2: 120 min / 10.6 cm
DC 3: 90 min / 8.0 cm
DC 4: 90 min / 8.0 cm
DC 5: 60 min / 13.0 cm
DC 6: 90 min / 17.5 cm
DC 7: 60 min / 12.0 cm

Detektion: DC 1: D 13 (350 nm), D 23, D 15 (350 nm)
DC 2: D 22
DC 3: D 9
DC 4: D 21
DC 5: D 4, D 24
DC 6: D 1
DC 7: D 2

Auftragemenge: 20 μl

4. 2. Hochdruckflüssigchromatographie

4. 2. 1. Bestimmung von Rutin

Konz. der Eichlösung:

Rutin: 2.48 mg

Hyperosid: 2.34 mg

in 10 ml MeOH

Probenaufarbeitung:

1 Dragee wurde im Mörser zerrieben, mit 2 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 2.3 mg Hyperosid) und auf 10 ml mit MeOH aufgefüllt. Anschließend wurde unter Ultraschall suspendiert. Von der Suspension wurde ein Teil filtriert.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule

Mobile Phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{Eisessig}$ 18:82:1

Fluß: 0.7 ml / min

Papiervorschub: 0.3 cm / min

Detektion: UV 350 nm / 0.02 AUFS

Injektionsvol.: 10 μ l

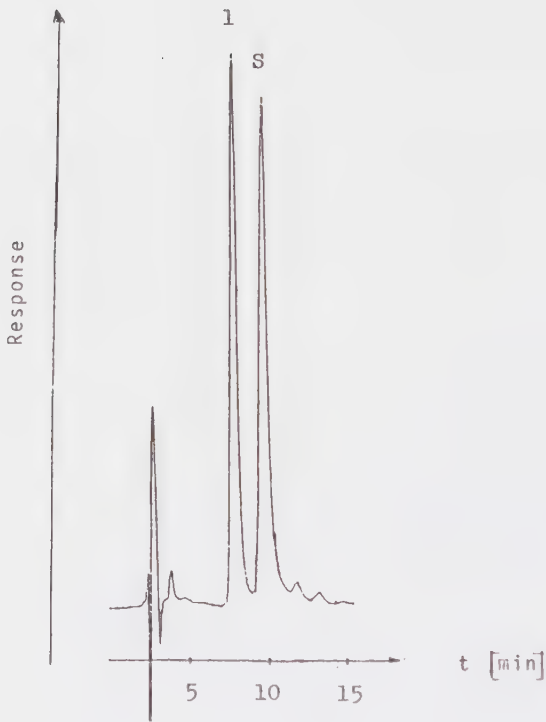


Abb. 63: Liquidchromatogramm der Probe zur Bestimmung von
Rutin in Repursan-Dragees
1 = Rutin, S = Hyperosid
(Bedingungen siehe S. 235)

4. 2. 2. Bestimmung von Ascorbinsäure, Nicotinamid, Thiaminhydrochlorid, Coffein, Riboflavin und Guaifenesin

Konz. der Eichlösung:

Coffein:	3.06 mg
Nicotinamid:	3.23 mg
Guaifenesin:	30.39 mg
Ascorbinsäure:	12.36 mg
Thiamin-HCl:	0.262 mg
Pyridoxin-HCl:	3.10 mg
Riboflavin:	0.25 mg
in 10 ml H ₂ O	

Probenaufarbeitung:

1 Dragee wurde im Mörser zerrieben, mit 1 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 3.1 mg Pyridoxin-HCl) und 5 ml H₂O versetzt, unter Ultraschall suspendiert und auf 10 ml mit H₂O aufgefüllt. Die Suspension wurde dann filtriert bis die Lösung klar war.

Bedingungen:

Säule:	Lichrosorb RP-8 (125-4) + Vorsäule
Mobile Phase:	CH ₃ CN/Pentansulfonat-Natrium 0.005 M 6:94
Fluß:	bis 15. Minute: 0.3 ml/min ab 15. Minute: 0.5 ml/min ab 20. Minute: 1.5 ml/min
Papiervorschub:	0.25 cm/min
Detektion:	UV 270 nm / 0.005 AUFS
Injektionsvöl.:	10 µl

Peakhöhe

Ascorbinsäure

[cm]

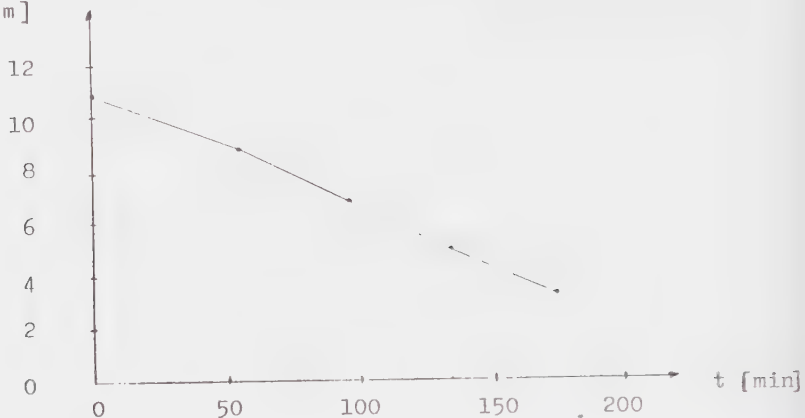


Abb. 64: Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration (dargestellt in Peakhöhen) in der wäßrigen Lösung der Probe als Funktion der Zeit.

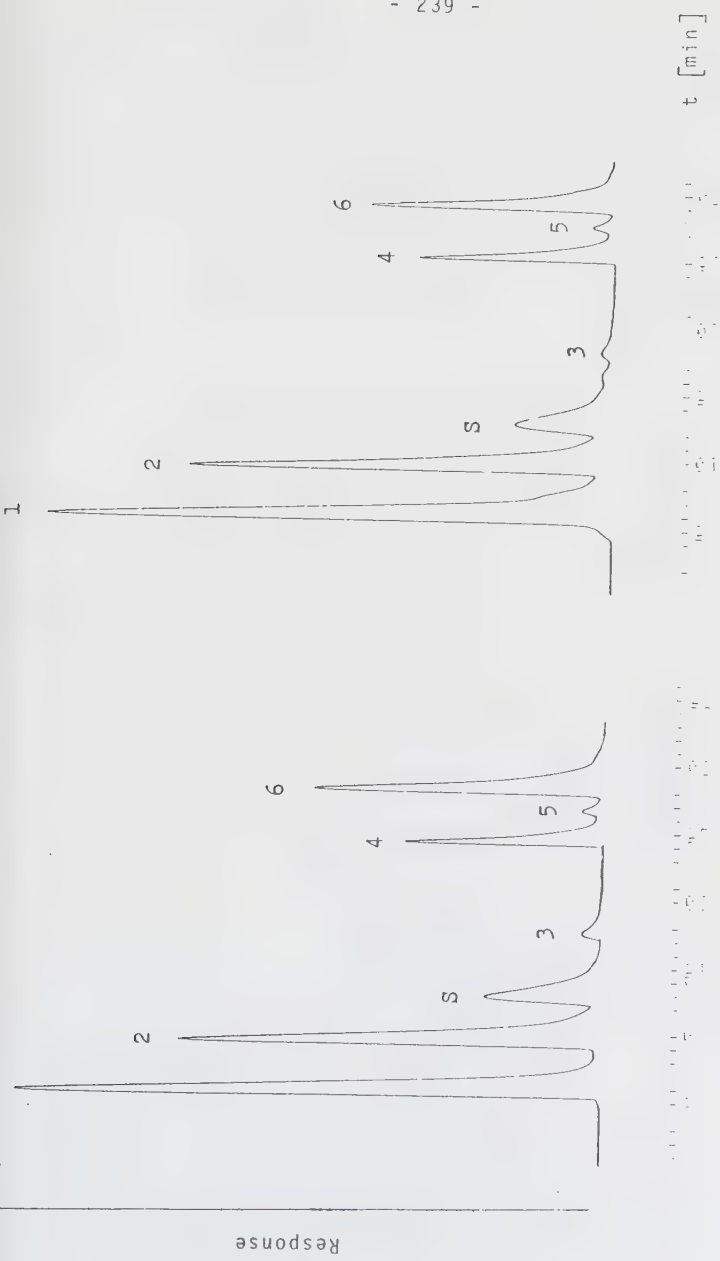


Abb. 65: Liquidchromatogramm der Eichlösung und der Probe zur Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine sowie von Coffein und Guaifenesin
 1 = Ascorbinsäure, 2 = Nicotinamid, 3 = Thiamin-HCl, 4 = Coffein, 5 = Riboflavin, 6 = Guaifenesin, 5 = Pyridoxin-HCl (int. St.)
 (Bedingungen siehe S. 237)

4. 2. 3. Bestimmung von Calciumpantothenat

Anfertigung einer Eichgeraden:

Es wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen an Calciumpantothenat in 5 proz. Eisessig (0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.8 mg/ml und 1.0 mg/ml) injiziert. Mit Hilfe der Peakflächen wurde eine Eichgerade erstellt.

Probenaufbereitung:

4 Dragees wurden im Mörser zerrieben, mit 5 proz. Eisessig auf 25 ml aufgefüllt und unter Ultraschall suspendiert. Das Filtrat der Suspension wurde dann in den Chromatographen injiziert.

Aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen Konzentration und Peakfläche konnten aus den ermittelten Peakflächen auf die Konzentration von Calciumpantothenat geschlossen werden. Wegen der geringen Empfindlichkeit des Refraktometerdetektors wurden gleichzeitig 4 Dragees aufgearbeitet.

Bedingungen:

Säule:	Lichrosorb RP-18 (125-4)
Mobile Phase:	5 proz. Eisessig in H ₂ O
Fluß:	0.9 ml/min
Papiervorschub:	0.5 cm/min
Detektion:	Refraktometer 4 x
Injektionsvol.:	25 µl

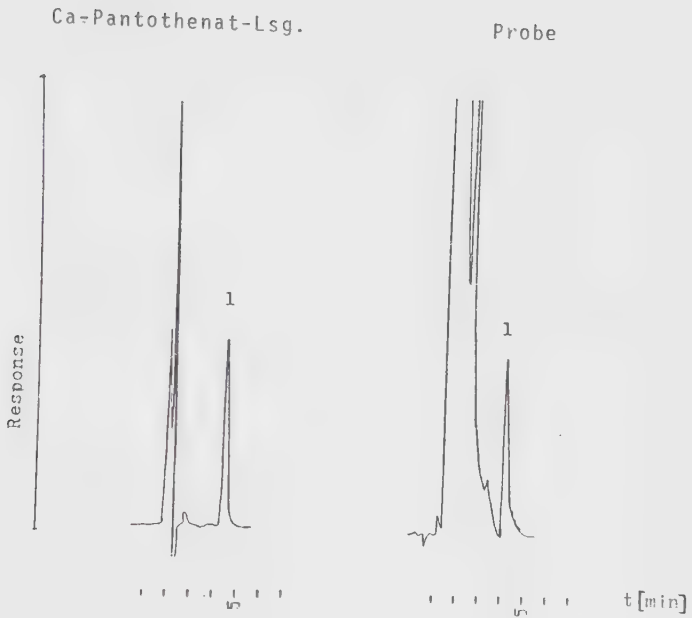


Abb. 66: Liquidchromatogramme einer Verdünnungslösung von Ca-Pantothenat zur Erstellung der Eichgeraden und der Probe

1 = Pantothensäure (Bedingungen siehe S. 240)

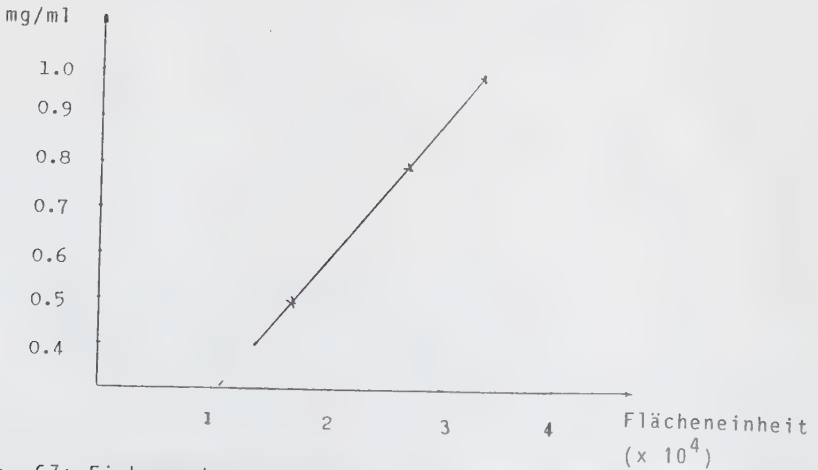


Abb. 67: Eichgerade zur externen Bestimmung von Ca-Pantothenat

4. 2. 4. Bestimmung von Retinolacetat und Tocopherolacetat

Konz. der Eichlösung:

Retinolacetat: 0.0381 mg

Vitamin D₃ (int. St.): 0.203 mg

Tocopherolacetat: 1.61 mg

in 2 ml MeOH/CH₂Cl₂ 9:1

Probenaufarbeitung:

1 Dragee wurde zerrieben und nach dem Zusatz von 1 ml der Stammlösung des int. Standards ($\approx$ 0.203 mg Vitamin D₃) in ca. 8 ml CH₂Cl₂ unter Ultraschall suspendiert. Dann wurde filtriert, das Filtrat auf 1 ml eingengt und in einem 2 ml Meßkolben mit MeOH/CH₂Cl₂ 9:1 bis zur Marke aufgefüllt.

Bedingungen:

Säule: Lichrospher 100 CH-8/2 + Vorsäule

Mobile Phase: CH₃CN/H₂O 9:1

Fluß: 1.0 ml / min

Papiervorschub: 0.3 cm / min

Detektion: UV 350 nm bis 7. min.

UV 288 nm ab 7. min

Injektionsvol.: 15 µl

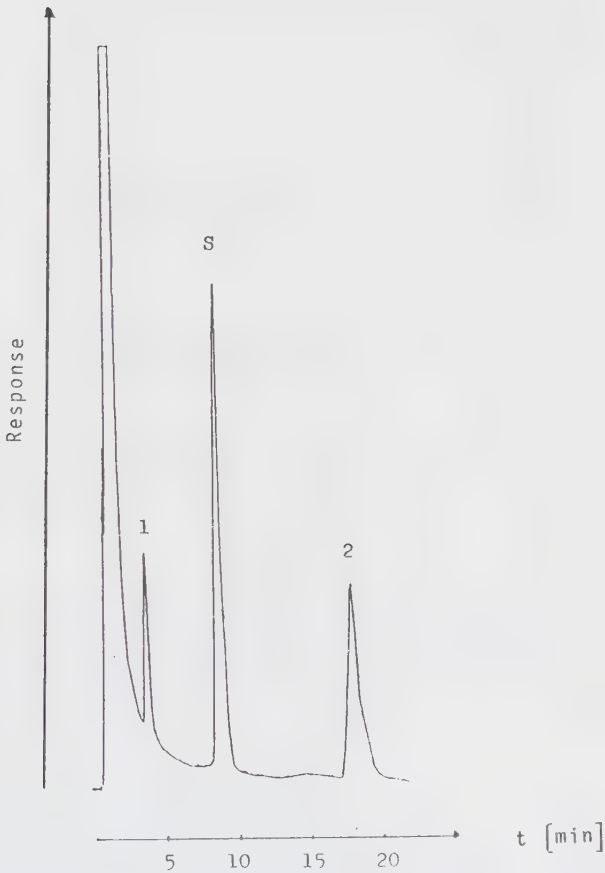


Abb. 68: Liquidchromatogramme der Probe zur Bestimmung
der fettlöslichen Vitamine
1 = Retinolacetat, 2 = Tocopherolacetat, S =
Vitamin D₃ (int. St.) (Bedingungen siehe S. 242)

4. 2. 5. Bestimmung von Yohimbin

Konz. der Eichlösung:

Extr. Yohimbe (Schwarzhaupt): 29.6 mg

Valium (int. St.): 0.22 mg

in 25 ml 60 proz. MeOH

Probenaufarbeitung:

1 Dragee wurde im Mörser pulvisiert, nach
Zusatz von 2 ml der Stammlösung des int. Stan-
dards wie das Eichgemisch aufgearbeitet.

Bedingungen:

Säule: Lichrosorb RP-8 (250-4) + Vorsäule

Mobile Phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEA}$ -Ammoniumformiatpuffer
0.01 M pH 7.9

Gradient: Startbedingungen: 40% CH_3CN
Gradientenverlauf siehe Bestimmung
von Yohimbin im Yohimbe-Extrakt
S.34

Fluß: 0.9 ml/min

Papiervorschub: 0.25 cm/min

Detektion: UV 254 nm / 0.005 AUFS

Injektionsvol.: 20 μl

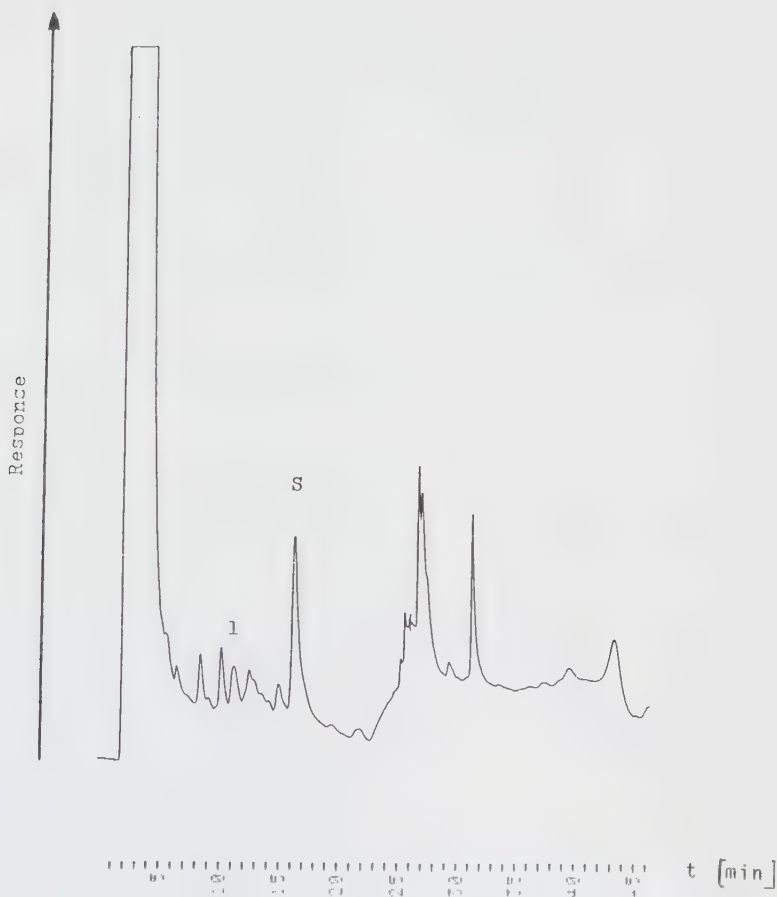


Abb. 69: Liquidchromatogramm der Probe zur Bestimmung von Yohimbin in Repursan.

1 = Yohimbin, S = Valium (int. St.)

(Bedingungen siehe S. 244)

III. Experimentelle Daten

1. Angaben zur Dünnschichtchromatographie

Sorptionsschicht:	Fertigglasplatten
	Kieselgel 60 F 254 (E. Merck)
	20 x 20 cm, Schichtdicke 0.25 mm
	Aluminiumoxid 60 F 254 (E. Merck)
	20 x 20 cm, Schichtdicke 0.25 mm
	Cellulose F 254 (E. Merck)
	20 x 20 cm, Schichtdicke 0.1 mm
	Nano-SIL C ₁₈ - 50 UV 254 (Macherey-Na)
	10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm
Fließmittelgemische:	siehe einzelne Analysenmethoden S. 20 ff
Auftragetechnik:	Aufgetragen wurde mit Hilfe kalibrierter Wegwerfkapillaren (5 µl) (CAMAG)
Detektion:	Fluoreszenzlöschung bei 254 nm
	Eigenfluoreszenz bei 254 nm und 350, bzw. 366 nm
	Geräte: UV-Lampe 254/350 nm (CAMAG)
	UV-Lampe 254/366 nm (CAMAG)
	Sprühreagenzien

Tabelle der Sprühreagenzien

D 1 Dragendorffs Reagenz 164)

Lösung a: 1.7 g basisches Wismutnitrat und 20 g Weinsäure in 80 ml H₂O
Lösung b: 16 g Kaliumjodid in 40 ml H₂O
Vorratslsg.: Lösung a/Lösung b = 1:1
Sprüchlsg.: 10 g Weinsäure in 50 ml H₂O und 5 ml Vorratslösung
Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur orange Färbung (Tageslicht)

D 2 Liebermann-Burchards Reagenz 164)

Sprüchlsg.: 5 ml Essigsäureanhydrid und 5 ml konz. Schwefelsäure in 50 ml EtOH
Anfärbung: 10 min bei 110°C erhitzen, rosa Färbung (Tageslicht)

D 3 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung 164)

Sprüchlsg.: 2.4 DNPH (0.4% in 2 n HCl)
Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur orange Färbung

D 4 Cer-(IV)-sulfat-Lösung 164)

Sprüchlsg.: 120 mg Cer-(IV)-sulfat, 4 ml H₂O und 1 g Trichloressigsäure mit konz. Schwefelsäure versetzen, bis eine klare Lösung vorliegt.
Anfärbung: 10 min bei 85°C erhitzen, violette Färbung

D 5 Jod-Salzsäure Reagenz ¹⁵⁸⁾

Sprühlsg. 1: 0.1 g Kaliumjodid und 0.2 g Jod
in 10 ml EtOH (96%)

Sprühlsg. 2: 5 ml Salzsäure (25%) und 5 ml
EtOH (96%)

Anfärbung: zuerst mit Lösung 1 dann mit
Lösung 2 besprühen, bereits bei
Raumtemperatur rotbraune Färbung

D 6 Van Urck Reagenz ⁵⁶⁾

Sprühlsg.: 0.1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd
in 10 ml 50 proz. (v/v) ethanol.
Salzsäure

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur blaß-
violette Färbung auf gelblichen
Untergrund

D 7 Fröhde Reagenz ⁵⁶⁾

Sprühlsg.: 0.1 g Ammoniummolybdat in 10 ml
50 proz. Schwefelsäure

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur grau-
grüne Färbung (Tageslicht)

D 8 Ammoniumvanadat Lösung ⁵⁶⁾

Sprühlsg.: 0.1 g Ammoniumvanadat in 10 ml
50 proz. Salpetersäure

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur braune
Färbung (Tageslicht)

D 9 Phosphormolybdänsäure Lösung ⁵⁶⁾

Sprühlsg.: 0.5 g Phosphormolybdänsäure in
100 ml 50 proz. Salpetersäure

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur
gelbliche Färbung (Tageslicht)

D 10 Isonicotinsäurehydrazid Lösung ¹⁶⁴⁾

Sprühlsg.: 1 g Isonicotinsäurehydrazid in
1 ml Eisessig in 100 ml EtOH

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur gelb-
liche Färbung (UV 350 nm)

D 11 Ethanol. Phosphormolybdänsäure Lösung ⁵⁸⁾

Sprühlsg.: 20 proz. ethanol. Lösung von
Phosphormolybdänsäure

Anfärbung: 5 min bei 100°C erhitzen, bläu-
liche Färbung (Tageslicht)

D 12 Kalilauge Lösung ⁵⁸⁾

Sprühlsg.: 10 proz. ethanol. Kalilauge

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur rote,
gelbe oder bläuliche Färbung (UV
365 nm), Verstärkung der Färbung
durch Erwärmen

D 13 Berliner-Blau Reagenz 58)

Sprühlsg.: 5 g Eisen-(III)-chlorid und 0.5 g
Kaliumhexacyanoferrat(III) in 100 ml H₂O

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur blaue
Färbung (Tageslicht)

D 14 Vanillin-Schwefelsäure Reagenz 58)

Sprühlsg.1: 5 proz. ethanol. Schwefelsäure
Sprühlsg.2: 1 proz. ethanol. Vanillinlösung

Anfärbung: zuerst mit Lösung 1 dann mit Lösung 2
besprühen. 10 min bei 100°C erhitzen,
verschiedene Färbungen (Tageslicht)

D 15 Naturstoff-Polyethylenglykol Reagenz 58)

Sprühlsg.1: 1 proz. methanol. Diphenylborsäure-
β-ethylaminoester-Lösung
Sprühlsg.2: 5 proz. ethanol. Polyethylenglykol-
4000-Lösung

Anfärbung: zuerst mit Lösung 1 dann mit Lösung 2
besprühen. Bei Raumtemperatur gelbe,
grüne oder orange Färbung (UV 350 nm)

D 16 Kedde Reagenz 58)

Sprühlsg.: Mischung aus je 5 ml einer 3 proz.
ethanol. 3,5-Dinitrobenzoesäure-
Lösung und einer 2 N Natronlauge.

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur rosa
oder violette Färbung (Tageslicht)

D 17 Salzsäure-Eisessig Reagenz 58)

Sprühlsg.: Konz. Salzsäure/Eisessig = 8:2

Anfärbung: 10 min bei 110°C erhitzen, blau-braune Färbung (Tageslicht)

D 18 Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure Reagenz 165)

Sprühlsg.: Lösung von 0.5 g Diphenylamin in 25 ml Aceton, 0.5 ml Anilin und 1.5 ml Phosphorsäure (85%)

Anfärbung: 10 min bei 100°C erhitzen, grüne blaue oder rötliche Färbung (Tageslicht)

D 19 Schweppes Reagenz 158)

Sprühlsg.: 0.2 g Glucose und 0.2 g Anilin in einem Gemisch aus H_2O , MeOH und Butanol (2:2:6)

Anfärbung: 10 min bei 125°C erhitzen, braune Färbung (Tageslicht)

D 20 Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz 164)

Sprühlsg.: 0.5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig und 1 ml konz. Schwefelsäure

Anfärbung: 10 min bei 110°C erhitzen, grünliche, blaue oder rötliche Färbung (Tageslicht)

D 21 Kaliumpermanganat-Schwefelsäure Reagenz 164)

Sprühlsg.: 0.5 g Kaliumpermanganat in 15 ml
konz. Schwefelsäure

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur
dunklere Färbungen (Tageslicht)

D 22 Ninhydrin Lösung 158)

Sprühlsg.: 0.3 g Ninhydrin in 100 ml Butanol
und 3 ml Eisessig

Anfärbung: 5 min bei 100°C erhitzen, orange
bis rötliche Färbung (Tageslicht)

D 23 Tillmans Reagenz 158)

Sprühlsg.: 0.04 proz. 2.6-Dichlorphenolindophenol-
Natrium-Lösung in 50 proz. EtOH

Anfärbung: bereits auf Raumtemperatur farblos
auf blauem Untergrund (Tageslicht)

D 24 Antimon-(III)-chlorid Lösung 158)

Sprühlsg.: 3 g Antimon-(III)-chlorid in 10 ml
ethanolfräiem CHCl_3 , 1

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur blaue
Färbung (Tageslicht)

D 25 Kaliumhexacyanoferrat Lösung (Thiochromreaktion) 164)

Lösung a: 1 proz. wäßrige Kaliumhexacyano-
ferrat-(III)-Lösung

Lösung b: 15 proz. Natronlauge

Sprühlsg.: 1.5 ml Lösung a werden mit 20 ml H₂O
verdünnt und 10 ml Lösung b zugegeben

Anfärbung: bereits bei Raumtemperatur blaue
Färbung (UV 350 nm)

D 26 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol Lösung 164)

Sprühlsg.1: 1 proz. methanol. 1-Chlor-2,4-
dinitrobenzol-Lösung

Sprühlsg.2: 3 M Natronlauge

Anfärbung: zuerst mit Lösung 1, dann mit
Lösung 2 besprühen, bereits bei
Raumtemperatur hellblaue Färbung
(Tageslicht)

2. Angaben zur Dickschichtchromatographie

Sorptionsschicht: Fertigglassplatten

PSC-Kieselgel 60 F 254 (E. Merck)
20 x 20 cm, Schichtdicke 2 mm

Auftragetechnik: aufgetragen wurde mit Hilfe einer
0.1 ml Pipette

Fließmittelge-

mische: siehe Analyse S. 63

Detektion: siehe Analyse S. 63

3. Angaben zur Hochdruckflüssigchromatographie

Pumpen:	M - 4000 (Waters) M - 45 (Waters)
Gradientengeber:	System Controller Model 720 (Waters)
Vorsäule:	Perisorb [®] RP-8 Kartusche (25-4) (E. Merck)
Analytische Säulen:	Lichrosorb [®] RP-8 (125-4 und 250-4) Lichrosorb [®] RP-18 (125-4 und 250-4) (Lichrocart [®] Kartusche, E. Merck) Lichrospher [®] 100 CH-8/2 (125-4) (Hibar [®] , E. Merck) Shandon ODS Hypersil [®] (125-4) (Fertigsäule, Bischoff)
Mobile Phase:	Acetonitril und Methanol (Lichrosolv [®] E. Merck) Wasser bidestiliert Ionenpaarreagenzien (Sigma) Säuren, Basen und Salze p.a. (E. Merck)
Injektionssysteme:	UK 6 (Waters) Wisp 710 B (Waters) Modell 7125 (Rheodyne)
Detektoren:	Differential Refraktometer R 401 (Waters) Variabler UV-Detektor SPD-2A (Shimadzu) Absorbance Detektor 440, Wellenlänge 254 nm (Waters)
Integratoren:	Data Module M 730 (Waters) D-2000 (Hitachi-Merck)

4. Photometrie

Spektralphotometer:	Uvikon 810 (Kontron)
Rechner:	Anacomp 220 mit Software "Multikomponentenanalyse"
Schreiber:	Printer-Plotter 800

5. Angaben zur Probenaufbereitung

Ultraschallbad:	Modell 221 (Branson)
Ionen	
Ionenaustauscher:	BOND ELUT [®] SCX (500 mg Sorbensmenge/2.8 ml Säulenvolumen) (Analytichem International)
	VAC ELUT [®] Absauggerät mit Vakuum-Kontroll-Vorrichtung (Analytichem International)
Adsorberharz:	Amberlite [®] XAD-2 (E. Merck) 0.3 - 0.9 mm Korngröße Länge der Säule: 4 cm Durchmesser der Säule: 1 cm

6. Angaben zur thermischen Abtrennung nach Stahl (TAS)

TAS-Ofen und Patronen (Desaga)

7. Angaben zu Vergleichssubstanzen

Die Vergleichssubstanzen für DC und HPLC bezog ich von den Firmen: E. Merck, Sigma, Fluka, C. Roth, Serva, Synopharm, Schering, Hoffmann La Roche, EGA-Chemie sowie vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

D. D I S K U S S I O N D E R E R G E B N I S S E

Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe dieser Methode konnten bei Verwendung von Vergleichssubstanzen nach Detektion mit UV-Licht verschiedener Wellenlängen und mit speziellen Sprühreagenzien zuverlässige Informationen über die in den Probenauszügen enthaltenen Wirksubstanzen erhalten werden.

Bei den Extrakten war meistens ein Ausschütteln mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität notwendig. Bei Substanzen, die nur in sehr geringer Menge im Arzneimittel enthalten waren, mußte die Probenzahl vergrößert werden. Verschiedene Extrakte konnten nur durch zweidimensionale DC und mit Hilfe eines reproduzierbaren, charakteristischen DC-Fingerprints eindeutig identifiziert werden. Auch bei der Suche nach Leitsubstanzen erwies sich die DC als die Methode der Wahl. Schließlich konnte von den Rf-Werten häufig auf die Elutionsfolge der Wirksubstanzen in der HPLC-Säule geschlossen werden.

Hochdruckflüssigchromatographie

Diese Methode eignete sich hervorragend zum Nachweis und zur Bestimmung zahlreicher Wirk- und Begleitstoffe in den Aphrodisiaka. Bei richtiger Wahl der Bedingungen kann die HPLC-Methode im Vergleich zur Dünnschichtchromatographie eine erheblich bessere Trennleistung aufweisen und sie hat, verglichen mit der Gaschromatographie eine Reihe weiterer Vorteile: Die zu analysierenden Substanzen müssen weder flüchtig noch unzersetzt verdampfbar sein, es genügt, wenn sie sich in der mobilen Phase (die vielfältig variiert) lösen.

Ich habe für meine Trennung durchwegs reversed-phase Säulen, deren Kieselgel allerdings oft durch unterschiedlicher Alkylkettenlängen (Octyl-, Octadecyl-) modifiziert war, sowie auch wechselnd Füllungen mit sphärischem oder gebrochenem Material unterschiedlicher Teilchengröße benutzt.

Zur Detektion habe ich der höheren Empfindlichkeit wegen, wenn eben möglich, einen UV-Detektor eingesetzt. Die dabei verwendete Wellenlänge wurde anhand der UV-Kurven und der Substanzkonzentrationen ausgewählt. Manche Substanzen, wie z.B. Mesterolone oder Calciumpantothenat, absorbieren jedoch so wenig im Meßbereich des UV-Detektors, daß ein Refraktometer-Detektor verwendet werden mußte. Bei einer von 25 verschiedenen Analysenmethoden wurde ein externer Standard verwandt, in allen anderen Fällen gelang es mir, einen geeigneten internen Standard zu finden. Die Vorteile sind dabei, daß sich Verluste an Wirksubstanzen bei der Probenaufbereitung weitgehend ausschließen lassen und Unterschiede im Injektionsvolumen (vor allem bei einem manuellen Einspritzsystem) ebenso wie Detektorfehler eliminiert werden können.

Bei Präparaten, die nur Reinsubstanzen enthalten, können nach der Auftrennung die Wirksubstanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit (z.B. Alkaloidsalze und fettlösliche Vitamine) nach dem Zusatz eines geeigneten internen Standards unter isokratischen Bedingungen bestimmt werden. Erheblich aufwendiger war die Analyse von Präparaten, die Extrakte enthalten. Alle von mir untersuchten Extrakte von der gleichen Pflanzentart stimmten qualitativ überein, zeigten aber oft auffallende Unterschiede im Gehalt der Hauptwirksubstanz (z.B. schwankte der Yohimbingehalt in Yohimbe-Extrakten von 1.17% bis 3.41%). Hierbei konnte erst nach der Bestimmung des Wirkstoffgehaltes im entsprechenden Extrakt über die Ermittlung des Wirkstoffgehalts im Arzneimittel auf die im Präparat vorhandene Menge an Extrakt rückgeschlossen werden.

wegen der Vielzahl von Substanzen unterschiedlicher Polarität war bei der Analyse von Extrakten zur Erreichung von kürzeren Analysenzeiten und einer besseren Peaksymmetrie eine Gradientenelution vorteilhaft. Die für die einzelnen Extrakte entwickelten Analysemethoden mußten dann oft wegen der hinzukommenden Reinsubstanzen und der Inhaltsstoffe weiterer Extrakte zur Analyse der Arzneimittel wieder modifiziert werden. Weitere Schwierigkeiten bereiteten die manchmal sehr unterschiedlichen Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen. Wirksubstanzen in sehr geringer Konzentration (z.B. enthielten Arzneimittel mit Yohimbe-Extrakten das Yohimbin nur in Mengen von 0.2 - 0.5 mg) konnten nicht bei ihren UV-Maximum detektiert werden, da die Absorption anderer Wirkstoffe bei dieser Wellenlänge nicht mehr ausreichte. Für Bestimmungen dieser Art wäre ein UV-Detektor mit in Zeitintervallen programmierbarem Wellenlängenwechsel von großem Vorteil. Ich habe einen solchen Wellenlängenwechsel zur Verbesserung der Response-Faktoren oder/und zur Unterdrückung von Peaks, die durch Verunreinigungen und Begleitsubstanzen gebildet wurden, manuell vorgenommen (Was ein gewisses Maß an Übung verlangt.).

Manchmal wurde das Eichgemisch mit einer bekannten Menge des selben Extrakts versetzt, um eine Integration zu erreichen, die mit der Probe identisch ist. Zur Bestimmung von Alkaloiden in Extrakten und in Pflanzenpräparaten mit mehreren alkaloidhaltigen Extrakten bewährte sich auch die Probenaufarbeitung mit einem Ionenaustauscher. Schließlich wurden auch Fluß-Stufengradienten angewandt; sie besitzen gegenüber Gradienten, bei denen die Zusammensetzung der mobilen Phase verändert wird, den Vorteil, daß eine Kalibrierungszeit nach jeder Analyse überflüssig ist. Allerdings können die Fluß-Stufengradienten, die vorwiegend die Analysenzeit verkürzen, kaum zur Lösung eines

Trennprobleme beitragen. Da jedes Präparat ein neues Trennproblem mit sich brachte, mußten oft die gleichen Substanzen in den verschiedenen Arzneimitteln auf unterschiedliche Weise analysiert werden (z.B. habe ich für Yohimbin 10 verschiedene HPLC-Methoden entwickelt).

Neben der Retentionszeit wurde für jede Substanz der Kapazitätsfaktor k' angegeben. Dieser ist wesentlich aussagekräftiger als t_R , da er unabhängig von Säulenlänge und Fluß das chromatographische Verhalten der Substanzen charakterisiert:

Definition:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R = Retentionszeit t_0 = Totzeit

Photometrie (Multikomponentenanalyse)

Bei einer Mischung geeigneter Analysesubstanzen braucht die UV-Multikomponentenanalyse am wenigsten Zeit. Die Probenaufarbeitung ist oft einfach und das Verfahren besteht im wesentlichen in einem Vergleich der UV-Kurven von Probenlösung und Vergleichsgemisch.

Dieses Verfahren ist jedoch meistens nur bei sehr einfachen Arzneimitteln (max 2 - 3 Wirksubstanzen mit Unterschieden in den UV-Maxima) anwendbar; bei Arzneiformen mit mehreren Reinsubstanzen, die entweder ähnliche UV-Kurven zeigen oder deren Konzentration sehr unterschiedlich sind, gelang es auch durch Messen bei verschiedenen Wellenlängenbereichen nicht für alle Wirksubstanzen quantitative Bestimmungen mit reproduzierbaren Werten durchzuführen. Wenn manchmal reproduzierbare Werte bei einzelnen Substanzen in Mehrstoffpräparaten erhalten wurden,

war dies auf die Dominanz der UV-Kurve dieser Substanz zurückzuführen, während Wirkstoffe, die in sehr geringer Menge enthalten waren, nicht registriert wurden. Die Anwendung der Multikomponentenanalyse auf Pflanzenpräparate war wegen der Vielzahl der absorbierenden Substanzen und dem daraus folgenden "cut off" nicht möglich. Ein weiterer, wesentlicher Nachteil gegenüber der HPLC besteht darin, daß eine Trennung fehlt und deshalb Zersetzungen von Wirksubstanzen nicht erkannt werden können. Schließlich muß man zur Anfertigung der UV-Spektren sämtliche Inhaltsstoffe (auch der Hilfsstoffe) kennen und beschaffen können, um sie in entsprechender Konzentration einem Eichgemisch zusetzen zu können. Die Multikomponentenmethode konnte ich erfolgreich bei der Bestimmung von Yohimbin in einfachen Zubereitungen wie "Yohimbin-Spiegel" und "Pluriviron" anwenden. Diese Bestimmungen können jedoch auch mit wesentlich geringeren apparativen Einsatz durch eine einfache UV-Bestimmung im Maximum von Yohimbin durchgeführt werden.

Ergebnisbeurteilung durch Fehlerrechnung

Grundsätzlich können bei Messungen systematische Fehler (z. B. Instrumentenfehler, mangelhafte Meßordnung), sowie zufällige Fehler (z. B. unbeeinflussbare Änderungen während der Messung) auftreten.

Eine statistische Auswertung erfaßt die zufälligen Fehler und erlaubt so eine Beurteilung der Genauigkeit der ermittelten Ergebnisse.

Bei den von mir erzielten Meßergebnissen habe ich den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten angegeben.

Der Mittelwert bzw. das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) zeigt den Schwerpunkt zur Verteilung¹⁶⁶⁾ an. Der Mittelwert ist die Summe der Beobachtungen (x_i), die durch die Gesamtzahl der Beobachtungen (n) dividiert wird.¹⁶⁶⁾

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Die Standardabweichung s gibt an, wie weit die Einzelmessungen um den Mittelwert streuen ¹⁶⁶⁾:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Der Variationskoeffizient VK stellt ein relatives Maß für die Standardabweichung dar (= relative Standardabweichung), indem er prozentual auf den Mittelwert bezogen ist:

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

Daher können verschiedene Mittelwerte unterschiedlicher Größenordnung hinsichtlich der Streuung um den Mittelwert verglichen werden ¹⁶⁷⁾.

Die relative Standardabweichung betrug bei Fertigarzneimitteln ohne Extrakte bis zu 4%, wobei die höheren Streuungen (3 - 4%) bei Substanzen auftraten, die nur in sehr geringer Konzentration im Präparat enthalten waren (die absolute Abweichung ist dennoch sehr gering).

Bei Pflanzenpräparaten waren auch höhere Abweichungen (bis ca. 6%) zu beobachten, da hier einerseits die Vielzahl der Komponenten wesentlich höhere Anforderungen an die Integration stellt, und andererseits der Gesamtherstellungsfehler der Extrakte sich in der späteren Analyse der Fertigprodukten niederschlägt. Dieser Gesamtherstellungsfehler setzt sich aus den Fehlern der Wirkstoffstandardisierung und der Arzneimittelherstellung zusammen. Der Fehler nimmt mit der Anzahl der Extrakte im Präparat zu ¹⁶⁸⁾.

Die Wiederfindung - beim HPLC-Verfahren - ermittelt durch nochmaliges Einspritzen der Eichlösung am Ende der Analysenreihe - lag in den meisten Fällen zwischen 95 und 105%. Die bei den Fertigarzneimitteln mit der HPLC-Methode ermittelten Werte stimmten meistens mit den vom Hersteller gemachten Angaben gut überein. Die Werte lagen zwischen 97% und 103% der Theorie, in wenigen Ausnahmen zwischen 90% und 110%. Größere Abweichungen traten im Tonol beim Magnesiumnicotinat mit 84.3% der Theorie auf, im Repursan beim Thiamin-HCl mit 69.2% und bei Retinolacetat mit 126% der Theorie.

Differenzierung der Extrakte

Eine quantitative Analyse der Extrakte tierischen Ursprungs im Fertigarzneimittel war mit den zur Verfügung stehenden Meßmethoden nicht möglich. So waren Testes-, Cerebrum- und Placenta-Extrakte weder mit der DC noch mit der HPLC in ihrer Zusammensetzung zu unterscheiden. Zwar enthielten alle getrockneten Organ-Extrakte Cholesterin (das sich durch DC- und HPLC-Methoden nachweisen ließ), Sexualhormone waren jedoch nicht nachweisbar. Ein Nachweis der Extrakte hinsichtlich ihres Ursprungs war allerdings mit Hilfe des Cholesteringehaltes oder des Peptidmusters in den Arzneizubereitungen möglich.

Im Muira Puama-Extrakt waren Wirksubstanzen nicht auffindbar. Jedoch gelang es mir, einige im Pflanzenreich weitverbreitete Substanzen (Sitosterin und Zucker) nachzuweisen; ein Nachweis des Muira Puama-Extraktes neben einem Yohimbe- oder einem Cola-Extrakt war jedoch nicht möglich. Alle übrigen Extrakte konnten aufgrund spezieller Inhaltsstoffe in den Fertigarzneimitteln, trotz der z.T. sehr geringen Mengen, nachgewiesen werden.

Anmerkung zur Verwendung von Extrakten

Da beim Muira Puama-Extrakt irgendwelche speziellen Wirkstoffe nicht auffindbar sind und bei den Organ-Extrakten in den verwendeten Mengen sicherlich von einer Hormonwirkung nicht die Rede sein kann, ist ihre Verwendung in Aphrodisiaka nicht gerechtfertigt - wenn man von einem Placebo Effekt absieht .

Der Muira Puama-Extrakt verdankt seine Verwendung in unserer Zeit wahrscheinlich seinem legendären Ruf als potenzsteigerndes Mittel, der durch keinerlei fundierte Untersuchungen begründet ist.

Der Zusatz von Organ-Extrakten an Stelle von Hormonen und von pflanzlichen Extrakten anstelle von Alkaloiden ist vermutlich, dadurch bedingt, daß bei diesen Arzneimitteln die Verschreibungspflicht entfällt.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

Aphrodisiaka, also Mittel, die den Geschlechtstrieb anregen und steigern sollen, enthalten oft in kompliziert zusammengesetzten Mischungen Substanzen unterschiedlichster Struktur und Eigenschaften wie Alkaloide, Steroide, Vitamine sowie Extrakte pflanzlichen und tierischen Ursprungs. Für den Nachweis war vor allem die Dünnschichtchromatographie geeignet, mit deren Hilfe sich bei Verwendung verschiedener Laufmittel und spezieller Detektionsverfahren die in den z. Zt. angebotenen Arzneimitteln enthaltenen Extrakte und Reinsubstanzen nachweisen ließen. Zur Gehaltsbestimmung wurden vereinzelt photometrische Methoden, vorwiegend jedoch - wegen des breiten Anwendungsbereichs - die reversed-phase Hochdruckflüssigchromatographie eingesetzt. Als mobile Phase waren neben Gemischen aus Acetonitril oder Methanol mit Wasser saure oder basische Puffersysteme und auch Reagenzien zur Bildung von Ionenpaaren geeignet.

Die Extrakte wurden über Fingerprint-Chromatogramme oder mit Hilfe bekannter Wirkstoffe charakterisiert; Extrakte derselben Pflanzenart unterschiedlicher Hersteller wurden miteinander verglichen.

Es gelang mehrfach in Fertigarzneimitteln viele chemisch unterschiedliche Verbindungen, oft auch mehrere Extrakte neben weiteren Reinsubstanzen gleichzeitig nach Zusatz eines geeigneten internen Standards unter optimierten Elutionsbedingungen und mit passenden Säulen zu trennen und zu bestimmen.

Die hier vorgelegten Untersuchungsergebnisse machen es nun möglich, daß eine Reihe von Extrakten pflanzlicher und tierischer Herkunft zuverlässig und reproduzierbar analysiert werden können und daß die wesentlichen Bestandteile der im Handel erhältlichen Aphrodisiaka rasch und sicher identifiziert und bestimmt werden können.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) E. Mutschler und B. Lemmer, Wörterbuch der Pharmazie, Band 2, 59, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1982)
- 2) H.S. Denninger, Ann. Med. Hist. 2, 383 - 393 (1930)
- 3) T.G. Waddell, H. Jones und A.L. Keith, J. Chem. Educ. 57, 341 - 342 (1980)
- 4) G. Madaus, Lehrbuch der biolog. Heilmittel, 2850 - 2853, G. Thieme Verlag Leipzig (1938)
- 5) P.W. Theis, Pharmazie in unserer Zeit 15, 53 - 56 (1986)
- 6) L. Spiegel, Chem. Ztg. 20, 970 (1896)
- 7) Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis IV, A, 4. Neuausgabe, 482 - 485, Springer Verlag Berlin (1977)
- 8) S. Borelli, R. Deopfner und H. Schurmann, Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten IV/3, 737 - 763, Springer Verlag Berlin (1960)
- 9) A. Morales, Selecta 47 (1982)
- 10) U.J. Jovanovic, Sexualmedizin 9, 453 - 457 (1980)
- 11) R. Maus, Sexualmedizin 4, 516 - 517 (1975)
- 12) U.J. Jovanovic und H.J. Vogt, Sexualmedizin 13, 510 - 517 (1984)
- 13) W. Remy, H.J. Vogt, W. Wittmann und B. Leitpold, Sexualmedizin 13, 331 - 338 (1984)
- 14) Lit. 4) 1932 - 1933
- 15) Lit. 7) 969 - 971
- 16) H. Gäbler, Dtsch. Apoth. 22, 94 - 96 (1970)
- 17) E.F. Steinmetz, Quart. J. Crude Drug Res. 11, 1787 - 1789 (1971)
- 18) K.F. Karasch, Apoth. J. 12, 68 - 69 (1986)
- 19) A. Auterhoff und E. Pankow, Arch. Pharm. 301, 481 - 489 (1968)
- 20) E. Pankow und H. Auterhoff, Arch. Pharm. 302, 209 - 212 (1969)
- 21) H. Auterhoff und B. Momberger, Arch. Pharm. 304, 223 - 228 (1971)
- 22) Lit. 7) IV, b 606 - 607
- 23) Lit. 4) 1604 - 1608
- 24) H. Wagner, Pharmazeut. Biologie 2, 2. Auflage, 179, G. Fischer Verlag Stuttgart (1982)
- 25) Lit. 4) 1041 - 1045
- 26) Lit. 7) IV, 229 - 235
- 27) Lit. 24), 178
- 28) Lit. 7) V, 101 - 104
- 29) M. Schmidt, Dtsch. Apoth. Ztg. 126, 2746 - 2747 (1986)
- 30) R. Wohlfart, Z. f. Phytotherapie IV, 393 - 395 (1982)
- 31) R. Wohlfart, G. Wurm, R. Hänsel und M. Schmidt, Arch. Pharm. 316, 132 - 137 (1982)
- 32) M. Angueta, P. Rovesti und E. Colombo, Rw. tac. Essenze, Profumi, Piane Offic. Aromi, Saponi, Cosmeto, Aerosol 53, 275 - 278 (1971)
nach C.A. 75, 143906j (1971)
- 33) M. Angueta, P. Rovesti und E. Colombo, Parfums. Cosmet. Savons. Fr. 2, 555 - 557 (1972)
nach C.A. 78, 62061q (1973)

- 34) A. Zenisek und J. Bednar, Am. Perfumer, Aromat. 75,
61 - 62 (1960)
nach C.A. 17, 15829e (1960)
- 35) C. Fenselau und P. Talalay Food. Cosmet. Toxicol.
11, 597 - 603 (1973)
nach C.A. 79, 134347h (1973)
- 36) Lit. 7 II, 322 - 324
- 37) H.J. Vogt, Dtsch. Apoth. 84, 442 - 446 (1982)
- 38) E. Mutschler, Arzneimittelwirkungen 4. Auflage,
336 - 340, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
mbH Stuttgart (1984)
- 39) W. Krause, Sexualmedizin 10, 430 - 435 (1981)
- 40) H.J. Vogt, Sexualmedizin 13, 68 - 73 (1984)
- 41) J.S. Blanch, Apoth. J. 12, 42 - 44 (1986)
- 42) R. Bitsch, Dtsch. Apoth. Ztg. 125, 391 - 398 (1985)
- 43) N. Both-Bedenbender und I. Elmadfa, Dtsch. Apoth.
Ztg. 126, 1601 - 1603 (1986)
- 44) H. Außerhoff, Wörterbuch der Pharmazie I, 448,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
(1985)
- 45) Lit. 44), 317
- 46) Lit. 38), 275 - 276
- 47) Lit. 44), 385
- 48) Lit. 38), 251 - 255
- 49) Lit. 38), 272 - 276
- 50) T. Takagi, S. Waleabayashi und H. Fukuoka, Nagoya
Med. J. 18, 79 - 89 (1972)
nach C.A. 78, 154787j (1973)
- 51) J. D. Phillipson, N. Supavita und L.A. Anderson, J.
Chromatogr. 244, 91 (1982)
- 52) R.L. Munier, Macheboeuf, Bull. Soc. chim. biol. 34,
852 (1952)
- 53) S.P. Agarwal und A.A.H. Elsayel, Planta Med. 45, 240 -
242 (1982)
- 54) P. Le Xuam, R.L. Munier und S. Meunier, Chromatographia
13, 693 - 697 (1980)
- 55) T. Daldorp, F. Susanto und P. Michalke, Fresenius Z.
Anal. Chem. 308, 413 - 427 (1981)
- 56) W.E. Court und M.H. Iwu, J. Chromatogr. 187, 199 -
207 (1980)
- 57) M. Wilk und U. Brill, Arch. Pharm. 301, 282 - 287 (1968)
- 58) H. Wagner, S. Bladt und E.M. Zgainski, Drogenanalyse,
68 - 69, Springer Verlag Berlin (1983)
- 59) W.E. Court und P. Timmins, Planta Med. 27, 319 - 329 (1971)
- 60) W.E. Court und M.S. Rabin, J. Chromatogr. 80, 101 - 109
(1973)
- 61) Y.A. Mohamed und M.A.M. El-Sayed, Pharmazie 27, 673 (1972)
- 62) H. Außerhoff und W. Schroeder, Pharm. Ztg. 116, 1846 -
1847 (1971)
- 63) L.P. Hackett und L.J. Pusci, Clin. Toxicol. 11, 353 -
370 (1977)
- 64) V.J. Mc Linden und A.M. Stenhouse, Forensic. Sci. Int.
13, 71 - 79 (1979)
- 65) R. Verpoorte und A.B. Svendsen, J. Chromatogr. 100,
227 - 234 (1974)

- 66) D.H. Rogers, J. Chromatogr. Sci. 12, 742 - 746 (1974)
- 67) M.R. Goldberg, L. Speier und D. Robertson, J. Liq. Chromatogr. 7, 1003 - 1012 (1984)
- 68) U.R. Cieri, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 867 - 873 (1983)
- 69) W. Kohl, B. Witte und G. Höfle, Planta. Med. 47, 177 - 182 (1983)
- 70) Th. Peckolt, Ber. d. dtsh. pharmaz. Ges. 1, 41 - 45 (1901)
- 71) G. Trier, Die Alkaloide 2. Auflage, 787, Verlag von Gebrüder Borntraeger Berlin (1931)
- 72) A. Toyota, R. Ninomiya, H. Kobayashi, K. Kawanishi, Y. Uhara, A. Kato und Y. Hashimoto, SHOYAKUGAKU ZASSHI 33, 57 - 64 (1979)
nach C.A. 91, 216742v (1979)
- 73) I. Ciulei, Methodology for Analysis of vegetable drugs, Ministry of chemical industry, Bukarest (1982)
- 74) Lit. 58), 291 - 304
- 75) K.J. Byrne, G.H. Reazin und A.A. Anderson, I. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 181 - 185 (1984)
- 76) W.J. Hurst, K.P. Snyder und R.A. Martin, J. Chromatogr. 318, 408 - 411 (1985)
- 77) D.B. Haughey, R. Greenberg, S.F. Schaal und J.J. Lima, J. Chromatogr. 229, 387 - 395 (1982)
- 78) K.T. Muir, M. Kunitani und S. Riegelman, J. Chromatogr. 231, 73 - 82 (1982)
- 79) P.V. Aerde, E. Moerman, R.v. Severen und P. Braelkeman, J. Chromatogr. 222, 487 - 474 (1981)
- 80) J.A. Apffel, T.V. Alfredson und R.E. Majors, J. Chromatogr. 206, 43 - 57 (1981)
- 81) J.v. Duijn und G.H.O.v. der Stegen, J. Chromatogr. 318, 408 - 411 (1985)
- 82) T.A. Tyler, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 745 - 747 (1984)
- 83) A. Yaneva, Tr. Nauchnoizsled. Khim. Farm. Inst. 11, 209 - 213 (1981)
nach C.A. 96, 187365v (1982)
- 84) C. Franzke, K.S. Grunert und G. Griehl, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 139, 85 (1969)
- 85) Lit. 56), 86
- 86) T.M. Malingre und S. Batterman, Pharm. Weekbl. 112, 1305 - 1310 (1977)
- 87) O. Somorin, Zh. Obshch. Khim. 43, 1851 - 1854 (1973)
nach C.A. 80, 34816 (1974)
- 88) O. Somorin, J. Food Sci. 38, 911 - 912 (1973)
- 89) G. Lehmann und B. Neumann, Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 155, 348 - 350 (1974)
- 90) S. El-Masry, N.N. Sabri und S.M. Khafagy, Egypt. J. Pharm. Sci. 20, 1 - 6 (1979)
nach C.A., 3596h
- 91) W. Wildanger, Dtsch. Lebensm.-Rdsch. 72, 160 - 161 (1976)
- 92) F. Belliardo, A. Martelli und M.G. ValTe, Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 180, 398 - 410 (1985)
S.J. Reid und T.J. Good, J. Agric. Food Chem. 30, 778 - 779 (1982)
- 93) S. El Masry und A.A.M. Wahbi, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 65 - 67 (1978)
- 94) M.A. Korany und A.A. Seif el Din, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 138 - 141 (1984)

- 95) E. Graf und C. Wittlinger, Dtsch. Apoth. Ztg. 125,
2417 - 2422 (1985)
- 96) A.M. Metwally, Pharmazie 33, 763 - 764 (1978)
- 97) A.M. Metwally, Pharmazie 30, 92 - 94 (1975)
- 98) E. Stahl, Dünnschichtchromatographie 2. Auflage,
429, Springer Verlag Berlin (1967)
- 99) R.T. Hunter und R.E. Creekmur, J. Assoc. Off. Anal.
Chem. 67, 542 - 545 (1984)
- 100) Lit. 58), 72
- 101) D.L. Sondack und W.L. Koch, J. Pharm. Sci. 62.
101 - 102 (1973)
- 102) G. Drasch und L.v. Meaer, Beitr. Gerichtl. Med. 36,
203 - 208 (1978)
- 103) J.R. Bushway, W.C. Cramer, A.R. Hanks und B.N. Colin,
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58, 957 - 960 (1975)
- 104) T. Egloff und A. Niederwieser, J. Clin. Chem. Clin.
Biochem. 20, 203 - 206 (1982)
- 105) L. Alliot, G. Bryant und P.S. Guth, J. Chromatogr. 232,
440 - 442 (1982)
- 106) G.M. Iskander, J. Strombom und A.M. Satti, J. Liq.
Chromatogr. 5, 1481 - 1492 (1982)
- 107) R. Verpoorte und A.B. Svendsen, J. Chromatogr. 109.
441 - 442 (1975)
- 108) R. Dennis, J. Pharm. Pharmacol. 36, 332 - 323 (1984)
- 109) M.D. Crouch und C.R. Short, J. Assoc. Off. Anal. Chem.
61, 612 - 615 (1978)
- 110) Lit. 98), 681
- 111) Lit. 58), 140 - 141
- 112) R. Hänsel und J. Schulz, Dtsch. Apoth. Ztg. 126,
2347 - 2348 (1986)
- 113) W. Kleber und N. Hums, Brauwelt 114, 414 - 418 (1974)
- 114) G.E. Otter und L. Tayler, J. Chromatogr. 133, 97 - 106
(1977)
- 115) M. Verzele und M. de Potter, J. Chromatogr. 166, 320 -
326 (1978)
- 116) B.M. Anderson, J. Chromatogr. 262, 448 - 450 (1983)
- 117) R. Hänsel und J. Schulz, Dtsch. Apoth. Ztg. 126,
2033 - 2037 (1986)
- 118) Lit. 98), 312 - 314
- 119) Lit. 98), 717 - 721
- 120) S. Voigt, M. Soile und K. Konitzer, J. Chromatogr. 17,
180 - 182 (1965)
- 121) M. de Los Angeles Barcelon, J. Chromatogr. 238, 175 -
182 (1982)
- 122) Lit. 98), 429 - 430
- 123) D.H. Rodgers, J. Chromatogr. Sci. 12, 746 (1974)
- 124) M. Amin, Instrum. HPTLC, Proc. Int. Symp. Instrum.
High Perform. Thin-Layer Chromatogr. (HPTLC) 1st, 9 - 37
(1980)
nach C.A. 94, 7812r (1981)
- 125) M. Petković und J. Tomin, Arh. Farm. 34, 153 - 156 (1984)
nach C.A. 102, 17773b (1985)
- 126) G.P. Cartoni, M. Ciardi, A. Giorrusso und F. Rosati,
J. Chromatogr. 279, 515 - 522 (1987)

- 127) Lit. 98), 257 - 259
- 128) Lit. 98), 284 - 298
- 129) A. Deschuytere und H. Deekstra, Fresenius Z. Anal. Chemi 324, 1 - 4 (1986)
- 130) R. Schuster, Hewlett-Pachard Application Note AN, 232 - 236 (9/1978)
- 131) Lit. 98), 498 - 499.
- 132) I.M. Johanson, K.G. Wahlund und G. Schill, J. Chromatogr. 149, 281 - 296 (1979).
- 133) E. Stahl, Dünnschichtchromatographie 1. Auflage, 270 - 271, Springer Verlag Berlin (1962)
- 134) W.G. de Ruig, H. Hooijernik und J.M. Vesemann, Fresenius Z. Anal. Chem. 320, 749 - 752 (1985)
- 135) E. Heftmann und I.R. Hunter, J. Chromatogr. 165, 283 - 299 (1979)
- 136) J.P. Chrombeen, J.C. Kraak und H. Pappe, J. Chromatogr. 167, 219 - 230 (1978)
- 137) K. Rehm und M. Steinigen, Pharm. Ztg. 126, 99 - 104 (1981)
- 138) M.J. Johansson, J. Liq. Chromatogr. 4, 1435 - 1457 (1981)
- 139) R.E. Graham, E.R. Biehl und C.T. Kenner, J. Pharm. Sci. 68, 871 - 875 (1979)
- 140) G. Carignan, B.A. Lodge, W. Shakum, J. Pharm. sci. 69, 1214 - 1216 (1980)
- 141) J. Hu und Z. Ye, Yaowu Fensci Zazhi 2, 169 - 171 (1982) nach C.A. 97, 233066e
- 142) S. Shigeoka, N. Miyatake, K. Kazuyuki und H. Haradu, Iyakuin Kenkyu 16, 151 - 154 (1985) nach C.A. 102, 209522r
- 143) G. Musumarra, G. Scarlatto, G. Romano, S. Clementi und S. Wold, J. Chromatogr. Sci. 22, 538 - 547 (1984) nach C.A. 102, 154850p
- 144) I. Grabowska, K. Marcinkowska und P. Polikseni, Ann. Acad. Med. Gedanensis 4, 101 - 110 (1974) nach C.A. 83, 15714y (1975)
- 145) J. Jarzebinski, Acta. Pol. Pharm 33, 599 - 604 (1976) nach C.A. 86, 146012c (1977)
- 146) J. Jarzebinski, S. Tonska und P. Sachochi, Acta. Pol. Pharm. 40, 71 - 76 (1983) nach C.A. 99, 110845f
- 147) F. Reimers, Arch. Pharm. Chemin. 78, 201 - 208 (1971) nach A.A. 22, 3475 (1972)
- 148) O.G. Genius, Dtsch. Apoth. Ztg. 33, 1261 - 1263 (1972)
- 149) M.J. Walters, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1428 - 1432 (1978)
- 150) J. Crommen, J. Chromatogr. 186, 705 - 724 (1979)
- 151) J.H. Block, J.W. Ayres, D.R. Henry und H.L. Levine, J. Chromatogr. 193, 111 - 117 (1980)
- 152) S.E. Roberts und M.F. Delaney, J. Chromatogr. 242, 364-368 (1982)
- 153) R. Enge, R.K. Müller und H.J. Wehran, Pharmazie 40, 153 - 173 (1985)

- 154) Lit. 98), 506 - 507
- 155) Lit. 98), 607 - 609
- 156) K. Wessely und K. Zech, HPLC in Pharmaceutical Analyses Hewlett-Packard Fig. 13 (1979)
- 157) W. Böhme, K. Oehme und M. Steinwand, Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 38, 88 - 91 (1984)
- 158) P. Pachaly, Dünnschichtchromatographie in der Apotheke, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1982)
- 159) R.P. Kwok, W.P. Rose, R. Tabor und T.S. Pattison, J. Pharm. Sci. 70, 1014 - 1017 (1981)
- 160) R.M. Kothari und M.W. Taylor, J. Chromatogr. 247, 187 - 192 (1982)
- 161) P. Jonvel, G. Andermann und J.F. Barthelemy, J. Chromatogr. 281, 371 - 376 (1983)
- 162) H. Wagner, G. Tittel und S. Blatt, Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 515 - 521 (1983)
- 163) D.R. Heidemann, J. Pharm. Sci. 68, 530 - 532 (1979)
- 164) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, E. Merck, Darmstadt (1980)
- 165) R.W. Bailey und E.J. Bourne, J. Chromatogr. 4, 206 (1960)
- 166) A.N. Martin, J. Swarbrick und A. Cammerata, "Physikalische Pharmazie" 1. Auflage 11 - 22, Wissenschaft. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1975)
- 167) E. Renner, Mathematisch - statistische Methoden in der praktischen Anwendung 2. Auflage, 33, Verlag Paul Perey Berlin (1981)
- 168) G. Harnischfegar, "Qualitätskontrolle von Phytopharmaka" 6, 115 - 116, G. Thieme Verlag Stuttgart (1985)

Lebenslauf

Name	Mayrhofer
Vorname	<u>Kurt</u> , Johannes
Geburtstag	23. November 1958
Geburtsort	Regensburg
Familienstand	ledig
Eltern	Josef Mayrhofer Cäcilia Mayrhofer, geb. Grubbauer
Schulbildung	
Sept. 1965 - Juli 1969	Volksschule Obertraubling
Sept. 1969 - Juli 1978	Werner v. Siemens Gymnasium, Regensburg
Berufsausbildung	
Nov. 1978	Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universi- tät München
Mai 1981	Vorprüfung Lebensmittel- chemie
Juni 1983	1. Staatsprüfung Lebens- mittelchemie
Aug ./Sept. 1983	Freier Mitarbeiter am Institut für Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes, Neuherberg
Nov. 1983	Beginn der Promotion unter An- leitung von Herrn Prof. Dr. F. Eiden, Institut für Pharma- zie und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Univer- sität München

